



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**SUPERDOSAGEM DE FITASE PARA FRANGOS DE CORTE E
POEDEIRAS LEVES**

GUILHERME SOUZA LIMA

AREIA – PARAÍBA
AGOSTO - 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**SUPERDOSAGEM DE FITASE PARA FRANGOS DE CORTE E
POEDEIRAS LEVES**

GUILHERME SOUZA LIMA
Zootecnista

AREIA - PARAÍBA
AGOSTO DE 2018

SUPERDOSAGEM DE FITASE PARA FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS LEVES

Autor: Guilherme Souza Lima

Tese apresentada à Universidade Federal da
Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, como
parte das exigências do Programa de
Doutorado Integrado em Zootecnia, para
obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.
Área de Concentração: Nutrição Animal

Comitê de orientação:

Professor Dr. Fernando Guilherme Perazzo Costa
Professor Dr. José Humberto Vilar da Silva
Professor Dr. Ricardo Romão Guerra

AREIA - PARAÍBA
AGOSTO DE 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

L732s Lima, Guilherme Souza.

Superdosagem de fitase em dietas de frango de
corte e
poedeiras leves / Guilherme Souza Lima. - Areia, 2018.
96 f. : il.

Orientação: Fernando Guilherme Perazzo Costa, José
Humberto Vilar da Silva, Ricardo Romão Guerra.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Digestibilidade ileal. 3.
Morfometria
intestinal. I. Costa, Fernando Guilherme Perazzo. II.
Silva, José Humberto Vilar da. III. Guerra, Ricardo
Romão. IV. Título.

UFPB/BC



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “Superdosagem de Fitase para Frangos de Corte e poedeiras Leves”

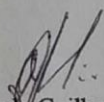
AUTOR: Guilherme Souza Lima

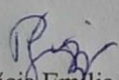
ORIENTADOR: Prof. Fernando Guilherme Perazzo Costa

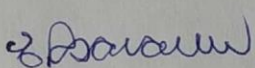
JULGAMENTO

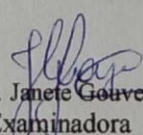
CONCEITO: APROVADO

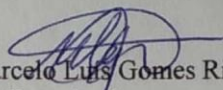
EXAMINADORES:


Prof. Dr. Fernando Guilherme Perazzo Costa
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Profª. Dra. Patrícia Emilia Naves Givisiez
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba


Prof. Dr. Edilson Paes Saraiva
Examinador
Universidade Federal da Paraíba


Profª. Dra. Janete Gouveia Souza
Examinadora
Universidade Federal do Rio Grande do Norte


Prof. Dr. Marcelo Luis Gomes Ribeiro
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Areia, 27 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME SOUZA LIMA – Nascido em 05 de agosto de 1990, na cidade de Piritiba – Bahia. Coursou o ensino fundamental no Instituto Presbiteriano de Educação (IPE) concluindo em 2004, logo em seguida foi para o ensino médio no Colégio Cecília Meireles (CCM) concluindo no ano de 2007, ambas as escolas situadas no município de origem. Em 2008 foi aprovado no processo seletivo, através do vestibular, e em 2009 começou o curso de Zootecnia na Universidade Federal da Paraíba – UFPB, na cidade de Areia - Pb, concluindo e obtendo o grau de Zootecnista no ano de 2013. No mesmo ano ingressou no Mestrado em Zootecnia na mesma instituição, direcionando à área de atuação em produção e nutrição de não ruminantes, concluindo em 2015 e ingressando logo em seguida no doutorado, pelo Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ).

*Aos meus pais Urival e Lúcia
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Talvez seja o tópico mais difícil de escrever, foram muitos dias de luta em busca do conhecimento, dos objetivos e para que isso se tornasse realidade dependi muito da ajuda e colaboração de todos, não só nos experimentos, disciplinas e qualificações, mas sim no dia a dia, na amizade, na palavra de apoio ou em apenas um gesto que lhe faz forte o suficiente para não desistir. E julgo que tudo isso só aconteceu porque uma força maior vinha preparando tudo com todos os detalhes pensados, no intuito de me fazer viver e dar valor a cada conquista. Deixo aqui registrado meus sinceros agradecimentos ao meu Deus por tudo!

Agradeço aos meus pais Urival e Lúcia. E digo que se cheguei até aqui o motivo foi eles. A única forma de conseguir retribuir tanta luta, amor e carinho é alcançando este objetivo. Gostaria de agradecer também aos meus irmãos Patrícia, Carol e Gustavo, todo apoio foi sempre bem vindo.

Deixo registrado um agradecimento especial a minha namorada Samara, que por muitos anos teve a paciência, amor e confiança, apoiando e fortalecendo meus passos dia a dia. Sei que não foi fácil compreender em alguns momentos a minha ausência, nada mais foi que a sobrecarga assumida durante este processo.

Agradeço, e muito, a Universidade Federal da Paraíba. Cheguei só com a coragem de vencer, e aqui tive todo o suporte para seguir neste objetivo. Obrigado a todos os servidores e professores que serviram de apoio, exemplo, dedicação e que humildemente compartilhou o conhecimento necessário para minha formação.

Ao professor Fernando Guilherme que sempre me deu suporte e viabilizou meu crescimento. Muitas vezes rigoroso e rígido nas atitudes e cobranças, mas exemplo de educação, conhecimento e liderança. Agradeço a oportunidade de compor o Grupo de Estudos em Tecnologias Avícolas onde conheci excelentes profissionais que fizeram e fazem parte do ciclo de amizades, a estes meu muito obrigado. Agradeço aos funcionários da Avicultura, e de forma especial deixo minha enorme gratidão ao amigo Josa, foram muitos momentos compartilhados, inclusive alguns que já mais serão esquecidos.

Por fim deixo uma mensagem para quem um dia ler estes agradecimentos: Seja humilde, seja grato, aceite e encontre sempre o lado bom de cada situação vivida, tudo é aprendizado e tudo passa, o que fica são as recompensas e as lembranças do caminho trilhado.

SUMÁRIO

Resumo Geral	12
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
CAPÍTULO 1	18
Fabricação e classificação das fitases: mecanismos de ação, eficiência e aplicações práticas	18
Introdução	19
Métodos de fabricação de fitase	20
Fermentação submersa	20
Fermentação em estado sólido	21
Vantagens e desvantagens entre os processos de obtenção das enzimas	22
Classificação das fitases	23
Histidina fosfatase ácidas (HFA)	24
Fitases β -hélice (FBH)	24
Fosfatase ácidas “purple” (FAP)	24
Cisteína fosfatase (CF)	24
Mecanismo de ação das enzimas fitases	25
Aplicações práticas e eficiência da utilização de fitase em dietas de aves	31
Considerações finais	37
Referências Bibliográficas	39
CAPÍTULO 2	46
Superdosagem de fitase bacteriana (<i>EC 3.1.3.26</i>) com redução nos níveis de aminoácidos digestíveis em dietas para frangos de corte	46
Resumo:	47
Abstract	48
Introdução	49
Material e Métodos	49
Desenho experimental, instalações e dietas	50
Variáveis Analisadas	52
Desempenho	52
Características de Carcaça	52
Morfometria intestinal	52
Digestibilidade Ileal	53
Análises Estatísticas	54
Resultados	55

Análise das dietas	55
Desempenho	55
Características de Carcaça.....	57
Morfometria intestinal.....	59
Digestibilidade Ileal	61
Discussão	67
Conclusão.....	72
Referências Bibliográficas	72
CAPÍTULO 3	75
Superdosagem de fitase bacteriana (<i>EC 3.1.3.26</i>) em dietas de poedeiras leves	75
Resumo:	76
Abstract	77
Introdução	78
Material e Métodos	79
Desenho experimental, instalações e dietas	79
Variáveis analisadas.....	81
Desempenho e Qualidade dos ovos.....	81
Morfometria Intestinal.....	81
Glicogênio e Esteatose Hepática	82
Morfometria de Magno	82
Dobras do Útero	83
Análise Estatística	83
Resultados	83
Desempenho e qualidade dos ovos.....	83
Morfometria Intestinal e aparelho reprodutivo	85
Discussão	89
Conclusão.....	93
Referências Bibliográficas	94

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 01 – Dietas experimentais para frangos de corte de 1 a 21, 22 a 35 e 36 a 45 dias de idade.....	47
Tabela 02 - Desempenho de frangos de corte alimentados com níveis crescentes de FTU em diferentes matrizes nutricionais.....	52
Tabela 03 - Desdobramento das interações de diferentes níveis de FTU associado a diferentes matrizes nutricionais nas variáveis de consumo de ração e conversão alimentar em frangos de 1 a 21 dias e na conversão alimentar de frangos de 1 a 35 dias.....	53
Tabela 04 - Características de carcaça de frangos de corte com 45 dias alimentados com níveis crescentes de FTU em diferentes matrizes nutricionais	54
Tabela 05 - Efeito da interação de diferentes níveis de FTU associado a diferentes matrizes nutricionais sobre o peso vivo de frangos de corte de 45 dias de idade	55
Tabela 06 - Morfometria do duodeno de frangos de corte com 21 e 45 dias	56
Tabela 07 – Desdobramento da interação de diferentes níveis de FTU associado a diferentes matrizes nutricionais sobre a relação entre a altura de vilo e a profundidade de cripta (V:C) do duodeno de frangos de corte com 21 e 45 dias de idade	56
Tabela 08 – Digestibilidade dos nutrientes em diferentes matrizes nutricionais com diferentes níveis de FTU	59

Capítulo 3

Tabela 01 - Dietas experimentais com superdosagem de fitase bacterina para poedeiras leves no segundo ciclo de produção (44 a 64 semanas).	76
Tabela 02 - Desempenho e qualidade de ovos de poedeiras leves no segundo ciclo de produção, alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase	80
Tabela 03 - Morfometria do duodeno e do epitélio do magno de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de fitase	81

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 01 – Estrutura química da molécula de ácido fítico. (Fonte: Brenda, 2017).....	21
Figura 02 – Reação de hidrólise do ácido fítico realizada por uma fitase (C.E. 3.1.3.8). (Fonte: Brenda, 2017).....	25
Figura 03 – Reação de hidrólise do ácido fítico realizada por uma fitase (C.E. 3.1.3.26). (Fonte: Brenda, 2017).....	26
Figura 04 – Reação de hidrólise do ácido fítico realizada por uma fitase (C.E. 3.1.3.72). (Fonte: Brenda, 2017).....	26

Capítulo 2

Figura 1 - Digestibilidade dos nutrientes em diferentes matrizes nutricionais	60
Figura 2 - Digestibilidade dos nutrientes em diferentes níveis de suplementação de FTU	60
Figura 3 - Média da digestibilidade ileal dos aminoácidos essenciais (MAAE) e não essenciais (MAANE) em diferentes matrizes nutricionais	61
Figura 4 - Média da digestibilidade ileal dos aminoácidos essenciais (MAAE) e não essenciais (MAANE) em diferentes níveis de FTU	61
Figura 5 - Digestibilidade dos nutrientes em diferentes matrizes nutricionais suplementadas com níveis crescentes de FTU	62
Figura 6 - Digestibilidade ileal dos aminoácidos não essenciais (AANE) em diferentes matrizes nutricionais em níveis crescentes de FTU	62
Figura 7 - Digestibilidade ileal dos aminoácidos essenciais (AAE) em diferentes matrizes nutricionais em níveis crescentes de FTU	63

Capítulo 3

Figura 01 - Fotomicrografias de epitélio do magno de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. A: 0 FTU; B: 500 FTU; C: 1000 FTU; D: 1500 FTU; E: 3000 FTU. As barras pretas demosntram a espessura dos epitélios do magno nos diferentes tratamentos. Coloração histoquímica de periodic acid Schiff.	82
--	----

- Figura 2** - Avaliação do score de esteatose hepática de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. Secore: 0 (ausência de esteatose), 1 (pouca esteatose), 2 (esteatose moderada) e 3 (esteatose avançada)..... 82
- Figura 3** - Fotomicrografias do fígado de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. A: 0 FTU; B: 500 FTU; C: 1000 FTU; D: 1500 FTU; E: 3000 FTU. Coloração histoquímica de periodic acid Schiff. 83
- Figura 04** - Concentração de glicogênio hepático em poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. *0 (ausência de positividade), 1 (pouca positividade), 2 (positividade moderada) e 3 (positividade intensa) 83
- Figura 05** - Avaliação do escore das dobras do útero de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. Poucas dobras - 1, dobras secundárias regulares - 2, dobras secundárias e terciárias regulares - 3, muitas dobras terciárias - 4.....84
- Figura 06** - Fotomicrografias das dobras do útero de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. A: 0 FTU; B:500 FTU; C: 1000 FTU; D: 1500 FTU; E: 3000 FTU. Coloração histoquímica de periodic acid Schiff.84

SUPERDOSAGEM DE FITASE PARA FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS LEVES

Resumo Geral: Os processos para a obtenção da enzima fitase variam e podem ser realizado basicamente de duas formas, sendo por fermentação em estado sólido (FES) ou através da fermentação submersa (FS). Todos os dois processos apresentam vantagens e desvantagens. São classificadas de acordo com o local de iniciação da desfosforilação do fitato, mecanismo catalítico e atividade de pH. Nesse contexto existem três tipos de fitases classificadas com base na posição específica de hidrólise inicial do fitato, sendo elas: 3-fitase, 4-fitase ou 6-fitase e a 5-fitase. Estas enzimas podem ser classificadas ainda com base nas suas propriedades catalíticas: histidina fosfatases ácidas (HFA), fitases β -hélice (FBH), fosfatases ácidas “purple” (FAP) cisteína fosfatase (CF), e uma última classificação é feita de acordo com o pH, a qual divide as enzimas fitases em ácidas e alcalinas. As fitases agem diretamente na molécula de fitato liberando fósforo, no entanto a superdosagem de fitase nas rações proporciona resultados que vão além da disponibilidade de fósforo podendo melhorar o desempenho geral e a eficiência da utilização de nutrientes, aumentando assim a eficiência da produção para os avicultores. Com intuito de avaliar a ação da fitase em uma superdosagem realizou-se dois experimentos com frangos de corte e poedeiras comerciais. Assim, objetivou-se avaliar a suplementação de superdosagens de fitase nas dietas com redução dos níveis de aminoácidos para frangos de corte de 1 a 45 dias sob os parâmetros de desempenho, características de carcaça, morfometria intestinal e digestibilidade ileal. Foram utilizados 1848 frangos machos da linhagem *COBB 500* divididos em doze tratamentos, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (três matrizes nutricionais com redução de 0; 5 e 10% nos níveis dos aminoácidos metionina, lisina e treonina digestíveis) e quatro níveis de fitase (0, 500, 1500 e 3000 FTU/kg), sete repetições de vinte e duas aves por unidade experimental. Para a digestibilidade ileal foi montado um experimento a parte seguindo o mesmo desenho experimental, no entanto foram utilizados 252 animais, distribuídos em doze tratamentos, 3 repetições de 7 aves cada. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, relata-se que é possível, após a suplementação de fitase em 1500FTU/kg, reduzir em até 10% os níveis dos três primeiros aminoácidos limitantes para frangos de corte de 1 a 45 dias sem afetar o desempenho produtivo dos animais. A superdosagem de fitase promoveu uma maior disponibilidade de fósforo e melhoria no trato digestivo das aves, aumentando a relação vilo:cripta, assim como a área do vilo. Fatores estes que são relacionados a proliferação celular, saúde intestinal e absorção dos nutrientes. Recomenda-se a redução nos níveis de Ca e P das dietas, valorizando a disponibilidade destes minerais pela matriz da enzima, e a suplementação de 1500 FTU/kg de fitase bacteriana. Esta superdosagem permitiu a redução de até 10% na suplementação dos aminoácidos metionina, lisina e treonina na dieta de frangos de corte. Para o experimento com poedeiras comerciais o objetivo foi avaliar a suplementação de fitase exógena em uma superdosagem para poedeiras leves no segundo ciclo de produção. Foram utilizados 320 poedeiras leves da linhagem Hy-line W-36, com idade entre 44 a 64 semanas, divididas em cinco tratamentos distribuídos em um delineamento

inteiramente casualizado com oito repetições e oito aves cada. As dietas foram formuladas para atender as exigências das aves baseada no manual de criação sendo elas isoproteicas e isoenergéticas. Para atender os níveis de 0, 500, 1000, 1500 e 3000 de FTU/kg, o inerte foi substituído por doses da enzima fitase nas seguintes proporções de zero, 0,100; 0,200; 0,300 e 0,600 kg/ton. As variáveis analisadas foram desempenho das aves e qualidade dos ovos, morfometria intestinal e do epitélio do magno, concentração de glicogênio e grau de esteatose hepática, e quantidade de dobras do útero. Observa-se diferença significativa entre os níveis de suplementação de fitase com ajuste de modelo quadrático para as variáveis: Peso do ovo (g), massa de ovo (g/ave/dia), conversão por massa de ovo (g/g), concentração de gema (%) e albúmen (%), espessura (μm) e resistência de casca (kgf), gravidade específica e cor da gema, e possibilitou uma melhora no aparelho digestivo das aves proporcionando uma melhor relação vilo:cripta, já para a espessura do epitélio do magno (μm) houve efeito linear, ou seja, quanto maior o nível de suplementação de fitase mais espesso foi o epitélio do mango. Nas variáveis de concentração de glicogênio, esteatose hepática e de dobras do útero a superdosagem de fitase proporciona maiores reservas energéticas no fígado e úteros com maior quantidade de dobras secundárias e terciárias caracterizando uma melhor eficiência do órgão, já para o score de esteatose hepática a superdosagem possibilitou uma maior probabilidade de surgimento do grau 1 de esteatose. Verificando os efeitos benéficos da superdosagem recomenda-se a suplementação de 1500 FTU/kg de fitase bacteriana em dietas a base de milho e farelo de soja para poedeiras leves de 44 a 64 semanas de produção.

Palavras-chave: Digestibilidade ileal, enzima, morfometria intestinal, fitato

PHYTASE SUPERDOSING FOR BROILER CHICKENS AND LIGHT LAYING

Abstract: The processes for obtaining the phytase enzymes vary and may be carried out basically in two ways, either by solid-state fermentation (SET) or by submerged fermentation (SF). Both processes present advantages and disadvantages according to the initiation site of phytate dephosphorylation, catalytic mechanism and pH activity. In this sense, there are three types of phytases classified based on the specific position of initial phytate hydrolysis: 3-phytase, 4-phytase or 6-phytase, and 5-phytase. These enzymes may be classified based on their catalytic properties: acidic histidine phosphatases (AHP), β -helix phytases (BHP), purple acid phosphatases (PAP) cysteine phosphatase (CP), and a last classification is made according to the pH, in acids and alkalis enzymes. Phytase acts directly on the phytate molecule releasing phosphorus, however phytase superdosing in feed provides results that go beyond phosphorus availability and can improve overall performance and nutrient utilization efficiency, thus increasing production efficiency for poultry systems. In order to evaluate the action of superdosing phytase, two experiments were carried out on broilers and commercial laying hens. The objective of this study was to evaluate the supplementation of phytase superdosing in diets with reduction of amino acid levels for broilers from 1 to 45 days under the parameters of performance, carcass characteristics, intestinal morphometry and ileal digestibility. We evaluated 1848 male broilers of the COBB 500 strain divided into 12 treatments. The animals were distributed in a completely randomized design in a 3x4 factorial scheme (three nutritional matrices with 0, 5 and 10% reduction in digestible methionine, lysine and threonine amino acid levels), and four phytase levels (0, 500, 1500 and 3000 FTU/kg), seven replicates of twenty-two birds per experimental unit. For the ileal digestibility, a separate experiment was set up following the same experimental design, however 252 animals were distributed in 12 treatments, 3 replicates of 7 birds each. After phytase supplementation at 1500FTU/kg, it is possible to reduce by up to 10% the levels of the first three limiting amino acids for broilers from 1 to 45 days without affecting performance of the animals. Phytase superdosing promoted a greater availability of phosphorus and improvement in the digestive tract of birds, increasing the ratio villus: crypt, as well as the villi area. These factors are related to cell proliferation, intestinal health and absorption of nutrients. It is recommended to reduce the Ca and P levels of the diets, valuing the availability of these minerals by the enzyme matrix, and the supplementation of 1500 FTU/kg of bacterial phytase. This superdosing allowed the reduction of up to 10% in the supplementation of the amino acids methionine, lysine and threonine in the diet of broilers. For the experiment with commercial laying hens the objective was to evaluate the exogenous phytase supplementation in an superdosing for light laying hens in the second production cycle. A total of 320 light laying hens of the Hy-line W-36 strain, aged 44 to 64 weeks, were divided into five treatments in a completely randomized design with eight replicates and eight birds each. The diets were formulated to meet the requirements of the birds based on the breeding manual being isoproteic and isoenergetic. To meet the levels of 0, 500, 1000, 1500 and 3000 FTU/kg, the inert was replaced with doses of the phytase enzyme in the following ratios of zero, 0.100; 0.200; 0.300 and 0.600 kg/ton. The variables

analyzed were poultry performance and egg quality, intestinal morphometry and magnum epithelium, glycogen concentration and degree of hepatic steatosis, and number of folds in uterus. Differences were observed between the levels of phytase supplementation with quadratic model adjustment for the variables: egg mass (g), egg mass (g/bird/day), feed conversion (g/g of egg mass), yolk concentration (%), albumen concentration (%), thickness (μm), and bark resistance (kgf), specific gravity and yolk color. The increasing levels of phytase supplementation allowed the improvement of the digestive tract of the birds providing a better relationship villus:crypt. The thickness of the magnum epithelium (μm) was linear, so, in the highest level of phytase supplementation the magnum epithelium was thicker. Phytase superdosing provides greater energetic reserves in the liver and uterus with greater amount of secondary and tertiary folds characterizing a better organ efficiency. The superdosing made it possible for steatosis grade 1 to appear. Therefore, for verifying the beneficial effects of superdosing it is recommended to supplement 1500 FTU/kg of bacterial phytase in corn and soybean meal diets for light laying hens from 44 to 64 weeks of production.

Key words: enzyme, ileal digestibility, intestinal morphometry, phytate

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A crescente demanda de produtos derivados da avicultura tem alavancando o setor e exigido alta produção com qualidade e sustentabilidade, atendendo uma clientela cada vez mais exigente. Para se manter em níveis competitivos com outras áreas a avicultura melhorou consideravelmente os índices produtivos alcançando ótimos parâmetros zootécnicos. Melhorias na genética, manejo, ambiência e nutrição garante que as aves consigam expressar bem seu potencial e produzir com eficiência.

Levando em consideração uma das estruturas de sustentação do setor avícola a nutrição é fator decisivo ao sucesso da criação e a garantia de sustentabilidade. Assim, novos produtos são desenvolvidos, associação adequada de produtos que visam oferecer níveis ideais de nutrientes disponíveis para as aves suprir suas exigências nutricionais. É neste contexto que a indústria e os centros de pesquisas desenvolvem cada vez mais alternativas viáveis destinadas ao setor produtivo, apresentando por exemplo as enzimas como aditivos tecnológicos capazes de reduzir custos de produção, assim como a poluição ambiental. Tais fatores tornaram estes aditivos atraentes para as pesquisas atuais com aves.

Considerado um aditivo alimentar que não possuem funções nutricionais diretas, as enzimas auxiliam no processo digestivo melhorando a digestibilidade e disponibilizando nutrientes que irão contribuir no metabolismo energético dos animais. Como exemplo deste aditivo alimentar, pode-se destacar as fitases, estas são enzimas capazes de quebrar a molécula de ácido fítico presente na maioria dos grãos e disponibilizar o fósforo que as enzimas endógenas dos animais não conseguem disponibilizar. A utilização desta enzima tornou eficaz a redução de fontes de fósforo nas dietas das aves, viabilizando custos e ao mesmo tempo diminuindo a excreção deste mineral via excreta dos animais.

Estudos elucidam bem a eficácia desta enzima na nutrição de aves, no entanto os níveis recomendados na literatura são de 500 FTU/kg para frangos de corte e 300 FTU/kg para poedeiras comerciais, sendo que a ação na molécula de fitato fica limitada a retirar apenas dois fósforos fítico, quando na verdade a molécula é composta por 6 moléculas de fósforo. Este efeito já possibilita a utilização desta enzima em larga escala no setor avícola. Porém, observa-se que os efeitos das fitases vão além destes benefícios, gerando uma hipótese, baseada nos benefícios extrafosfórico, que uma superdosagem de fitase melhora a eficiência alimentar, preservando o aparelho

digestivo das aves tendo influência positiva no aparelho reprodutor de poedeiras comerciais. Contudo, os experimentos aqui desenvolvidos têm o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de superdosagem de fitase para frangos de corte e poedeiras comerciais.

CAPÍTULO 1

Fabricação e classificação das fitases: mecanismos de ação, eficiência e aplicações práticas.

Introdução

A produção animal cresceu e juntamente com este crescimento surgiram novos desafios às empresas que fornecem insumos a este setor. Procuram-se alternativas que minimizem custos de produção e redução da poluição ambiental. Para tanto, a melhoria da digestibilidade dos alimentos e absorção dos nutrientes é ponto-chave neste processo, porém, existem alguns componentes presentes nos ingredientes reduzem a disponibilidade dos nutrientes e influenciam nos processos digestivos do organismo.

O fitato ou fósforo fítico é a principal forma de armazenamento do fósforo presente nos grãos comumente utilizados em rações para os animais, entretanto, apenas uma pequena quantidade deste fitato está naturalmente disponível para aproveitamento. Além de tornar o fósforo indisponível, também são observados efeitos negativos sobre a digestão e absorção de outros minerais, aminoácidos e energia (Gautier et al., 2018), além de atuar como fator irritante sobre o intestino, o que leva a maiores perdas endógenas (Selle & Ravindran, 2007). Nesse contexto surgiram as enzimas exógenas denominadas fitases, as quais são fornecidas às dietas animais sem que haja risco à saúde animal e principalmente não deixem resíduos nos produtos comercializáveis.

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas nos sistemas biológicos, ou seja, participam de reações de síntese e degradação do metabolismo animal, sem serem elas próprias alteradas neste processo (Champe & Harvey, 1989). Sua atividade é específica para determinadas reações e substratos, sendo que as enzimas digestivas possuem um sítio ativo que permite que elas atuem sobre determinada ligação química sob condições favoráveis de temperatura, umidade e pH (Penz Júnior, 1998).

As fitases ou mio-inositol fosfohidrolases hexafosfato formam um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise dos fitatos, geralmente produzindo inositol, inositol monofosfato e fosfato inorgânico, aumentando a disponibilidade de fósforo para a absorção (Casey & Walsh, 2004). São amplamente difundidas na natureza podendo ser derivadas de animais, plantas e microrganismos.

O fitato é o principal substrato encontrado nas dietas de não ruminantes para a ação das fitases. As moléculas de fitato podem interferir na digestibilidade de vários nutrientes das rações, agindo como fator antinutricional em várias etapas do metabolismo. Assim, a fitase surge com intuito de neutralizar tais efeitos convertendo isto em melhoria na produtividade animal.

Existem duas formas de obtenção destas enzimas para serem comercializadas pela indústria, sendo que o produto final, a fitase, tende a ter o mesmo objetivo e participação no metabolismo e digestibilidade dos alimentos. A diferença entre estas enzimas é especificidade com relação a sua estrutura química, tendo classificações distintas e diferentes formas de agir no substrato.

Tendo em vista o crescimento industrial deste produto e a crescente demanda tecnológica no setor produtivo, uma série de conceitos e aplicabilidades são descritos na literatura voltadas à nutrição de aves, possibilitando um maior entendimento dos efeitos destes aditivos no metabolismo digestivo. Assim, objetivou-se reunir informações sobre a produção, classificação e os mecanismos de ação das enzimas fitases e as aplicações práticas em dietas de aves.

Métodos de fabricação de fitase

Os processos para a obtenção da enzima fitase variam e podem ser realizado basicamente de duas formas, sendo por fermentação em estado sólido (FES) ou através da fermentação submersa (FS). Na fermentação em estado sólido as enzimas são produzidas diretamente sobre um substrato sólido, como cereais ou derivados, e permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas específico para os diferentes substratos utilizados no processo (Gunashree & Venkateswaran, 2008). Já na fermentação submersa o microrganismo é cultivado em um meio líquido rico em nutrientes os quais serão utilizados para a produção das enzimas e metabólitos, os microrganismos excretam as enzimas produzidas para o meio líquido de fermentação.

A síntese de fitase efetuada pela membrana celular de microrganismos é comercialmente a forma mais promissora de produção da enzima, e apesar da habilidade de produção das bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados, pois apresentam maior estabilidade térmica (Pandey et al., 2001a).

Fermentação submersa

Produção em grande escala pela prática de fermentação submersa necessita de fermentadores com grande capacidade de volume (Ellaiah et al., 2004). Todo processo de fermentação submersa inicia-se com o processo conhecido como *upstream* ou montante da fermentação. É realizado o cultivo do microrganismo que servirá como

pré-inóculo até a fase conhecida como fase de crescimento exponencial média ou tardia, Após esta etapa, os microrganismos são transferidos para os fermentadores intermediários contendo meio de cultivo específico para a produção da enzima. Após o período de crescimento todo esse conteúdo considerado pré-inóculo é transferido para o fermentador principal (Sant'ana Junior, 2001).

Os fermentadores utilizados durante o processo de fermentação possuem serpentinas internas para o aquecimento e refrigeração se necessário e sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e espuma. Para determinar o término do processo de fermentação, o parâmetro de controle mais representativo é a atividade enzimática, contudo outros parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, características do caldo fermentado podem ser utilizados (Sant'ana Junior, 2001).

Após a fermentação, processo conhecido como *downstream* visam recuperar as enzimas produzidas, havendo assim as etapas de separação e purificação removendo as substâncias indesejadas que foram produzidas durante todo processo de fermentação. As células microbianas são separadas por centrifugação, os fungos por filtração e as bactérias necessitam de técnicas de filtragem mais avançadas (Sant'ana Junior, 2001).

Na etapa de acabamento, as preparações enzimáticas brutas ou purificadas podem ser mantidas na forma líquida, granulada ou liofilizada com a adição de estabilizadores, como sais, carboidratos ou proteínas inertes, como a albumina bovina sérica (BSA). Para a preservação da atividade da enzima e de sua conformação nativa, aditivos, modificação química controlada ou imobilização enzimática podem ser empregados. Durante o período de armazenamento e comercialização até a sua utilização, as preparações enzimáticas devem manter as suas características, assim, o fabricante normalmente indica quais as condições de armazenamento necessárias e a validade da atividade enzimática nestas condições (Gerhartz, 1990).

Uma forma de produção de fitase por fermentação submersa utiliza a tecnologia do DNA recombinante, modificando geneticamente alguns microrganismos, em estudo realizado por Mullaney et al. (1991) foi realizado a clonagem e expressão dos genes de fitase fúngica de *Aspergillus niger*.

Fermentação em estado sólido

O processo de fermentação sólida (FES) é feita em meio a substratos sólidos na ausência total ou quase total de água (Pandey, 2001b), o que faz com que essa condição de crescimento tente se aproximar do habitat natural do fungo (Silva et al., 2005).

Produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, na forma de resíduos não processados, são empregados na FES como substratos para servirem de matrizes sólidas e fornecerem carbono e fontes de energia para o crescimento do microrganismo, além de apresentarem um custo relativamente baixo. Esses substratos são divididos em três grupos: os que apresentam amido como fonte de carbono principal (arroz, batata, mandioca e milho, entre outros), os que apresentam celulose ou lignina como fonte de carbono principal (madeira e palhas) e os que apresentam açúcares solúveis como fonte de carbono principal (forragem, polpas de frutas e beterraba, entre outros) (Paris, 2008).

Semelhantemente à fermentação submersa, na fermentação em estado sólido as etapas geralmente necessárias são: uma seleção cuidadosa das matérias-primas a serem utilizadas, tratamento prévio do substrato a ser utilizado no meio sólido, a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita, o controle da mesma, a separação e, em alguns casos, a purificação exaustiva dos produtos desejados (Zadrazil & Punia, 1995).

Vantagens e desvantagens entre os processos de obtenção das enzimas

Como vantagens da FS podem ser consideradas a relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados (Couto & Sanroman, 2006). No entanto, uma desvantagem desta técnica é o fator econômico, já que os meios utilizados no preparo da fermentação muitas vezes apresentam alto custo (Feitosa, 2009), ainda há uma maior probabilidade de contaminação, devido a grande quantidade de água utilizada (Alonso, 2001).

A FES apresenta algumas vantagens como: meio de cultura simples, redução dos efluentes líquidos a tratar, diminuição do risco de contaminação do meio, menor exigência de água quando comparada à FS, baixo investimento, condições de cultura próximas ao dos meios naturais, fácil aeração devido à porosidade do material, utilização direta dos sólidos fermentados, extração facilitada pela alta concentração de produtos, baixa demanda de energia. Já entre as desvantagens, podem ser citadas: risco de elevação excessiva de temperatura, difícil regulação dos parâmetros pH e umidade,

pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático) e alta taxa de inoculação microbiana quando não se utiliza a microflora natural (Spier, 2005).

Segundo Vats et al., (2004) as condições da cultura, concentração, natureza do substrato e a disponibilidade dos nutrientes são fatores que devem ser considerados na escolha da técnica a ser utilizada na produção de fitase. Outro fator que deve ser levado em consideração é o custo de produção.

Observa-se que na fermentação submersa as principais fitases produzidas são as bacterianas (Mittal et al., 2012) de leveduras (Ushasree et al., 2014) sendo observada também a produção a partir de fungos (Bhavsar et al., 2013). No entanto a fermentação em estado sólido demonstra ser a principal opção na fabricação destas enzimas (Qvirist et al., 2015).

Classificação das fitases

São classificadas de acordo com o local de iniciação da desfosforilação do fitato, mecanismo catalítico e atividade de pH.

Segundo o sistema de informação enzimática (Brenda, 2017), existem três tipos de fitases classificadas com base na posição específica de hidrólise inicial do fitato, sendo elas: 3-fitase, 4-fitase ou 6-fitase e a 5-fitase.

- A 3-fitase é classificada com números correspondentes da Comissão de Enzima 3.1.3.8 conhecida também por nome sistemático de Mio-inositol-hexaquisfosfato 3-fosfohidrolase. Inicia a hidrólise do fitato no grupo da terceira posição e é isolada de *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Pseudomonas* e *Klebsiella sp. ASR1*.
- A 4-fitase, também conhecida como 6-fitase possui classificação enzimática com números correspondentes da Comissão de Enzima 3.1.3.26 e nome sistemático de Mio-inositol-hexaquisfosfato 4-fosfohidrolase. Hidrolisa no sexto grupo fosfato e é extraída de *E. coli*, *Paramecium*.
- A 5-fitase possui classificação enzimática com numeração correspondente da Comissão de Enzima 3.1.3.72 e nome sistemático 5-fosfohidrolase de Mio-inositol-hexaquisfosfato. Inicia a hidrólise do fitato no quinto grupo fosfato e é isolada de *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris* e *Pisum sativum*.

As fitases também são classificadas com base nas suas propriedades catalíticas: histidina fosfatases ácidas (HFA), fitases β -hélice (FBH), fosfatases ácidas “purple” (FAP) cisteína fosfatase (CF) (Mullaney & Ullah, 2003; Puhl et al., 2007; Li et al., 2010).

Histidina fosfatase ácidas (HFA):

As histidina fosfatase ácidas são as fitase mais conhecidas e estudadas por haver um sitio ativo comum (RHGxRxP) e um mecanismo de duas etapas para a hidrólise de fitase (Mullaney & Ullah, 2003), estas enzimas foram relatadas principalmente em fungos fúteis e leveduras (Singh & Satyanarayana, 2011).

Fitases β -hélice (FBH):

A nomenclatura desta classe de fitase foi dada por sua estrutura possuir um modelo tridimensional assemelhando-se a uma hélice com seis lâminas e foram encontradas em bactérias *Bacillus ssp.* (Ha et al., 2000). Tem sua atividade máxima em pH de 6,0 a 8,0 (Fu et al. 2008) e são capazes de hidrolisar o cálcio ligado ao fitato (Shin et al. 2001).

Fosfatase ácidas “purple” (FAP):

Este grupo de fitases é conhecido por exibir uma atividade catalítica inferior. A presença delas foi relatada em plantas, recebendo a nomenclatura de GmPhy, sendo essa variedade conhecida como única FAP que possui uma atividade de fitase significativa (Hegeman & Grabau, 2001).

Cisteína fosfatase (CF):

Observada em bactérias ruminais anaeróbica (*Selenomonas Ruminantium*) a cisteína fosfatase é outra classe de fitase (Mullaney e Ullah, 2003).

A estrutura e o mecanismo catalítico proposto de *Selenomonas ruminantium* são semelhantes à superfamília da fosfatase de cisteína. Esta classe de fitase é capaz de acomodar o substrato e hidrolisar o ácido fítico gerando o inositol-2-monofosfato (Chu et al., 2004).

A classificação de acordo com o pH divide as enzimas fitases em ácidas e alcalinas, estando na primeira classe citada as Histidina Fosfatase Ácidas (HFA),

Fosfatase ácidas “purple”, Cisteína Fosfatase (CF). Já as alcalinas compreendem apenas as Fitases β -hélice (FBH) das espécies de *Bacillus ssp.* (Singh & Satyanarayana, 2015).

Mecanismo de ação das enzimas fitases

O substrato fitato

Para entender como as fitases agem no organismo animal é de suma importância conhecer o substrato onde efetivamente ela atuará, nesse contexto pode-se observar a molécula de fitato como o principal substrato das fitases.

Para Selle e Ravindran (2007), o termo fitato refere-se quimicamente ao sal do ácido fítico, que é uma estrutura de baixo peso molecular, formada por seis grupos fosfatos ligada a uma molécula com seis carbonos (Figura 01).

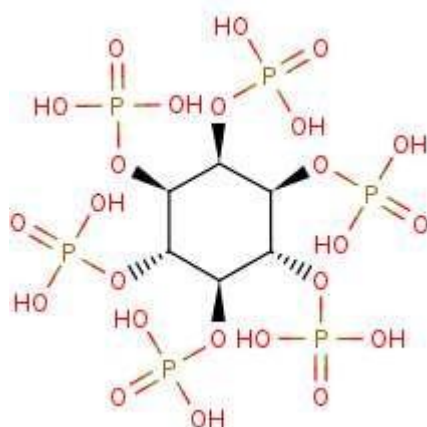


Figura 01 – Estrutura química da molécula de ácido fítico. (Fonte: Brenda, 2017).

O fitato (IP_6), também conhecido como ácido fítico (mio-inositol hexaquisfosfato), é um composto orgânico de ocorrência natural que pode ser encontrado em muitos grãos de cereais, sementes oleaginosas, legumes e plantas, possuindo 60-90% de fósforo total desses vegetais, sendo, assim, sua maior fonte de armazenamento (Zuo et al., 2010) e possuem o papel fisiológico de reserva de fósforo e energia. Atua também como um imobilizador de cátions multivalentes e como regulador dos níveis de fosfato inorgânico (Cosgrove, 1963).

O acúmulo de fitato nas sementes e nos grãos ocorre durante o amadurecimento sendo armazenado nas partículas de aleurona e cristais de formato globoso. Este processo de armazenamento ocorre juntamente com a deposição do amido e dos lipídeos que são consideradas substância de armazenamento (Reddy et al., 1982; Tyagi et al.,

1998). Porém, há relatos que a localização do fitato varia entre os diferentes ingredientes; no trigo, na cevada e no arroz situa-se nas células de aleurona e no milho a maioria do fitato localiza-se nas células germinativas (O'Dell et al., 1972). Nas oleaginosas, como a soja, a molécula de ácido fítico tende a estar presente ao longo de toda semente (Erdman, 1979). Estas particularidades dos fitatos em diferentes vegetais podem interferir na sua susceptibilidade para a ação enzimática das fitases, sendo que existem fitatos que são mais facilmente hidrolisados (Morgan et al., 2016).

Segundo Ravidran (1995) em dietas para aves, existe cerca de 2 a 4 g de fitato por quilo de ração e a molécula de fitato possui alta quantidade de fósforo. Um quilo de fitato possui cerca de 282 g de fósforo. Porém estes animais não conseguem absorver o fósforo presente nesta molécula por não possuir a enzima fitase no trato gastrointestinal, sendo necessário a suplementação com outra fonte de fósforo na dieta (Gargova et al., 1997), além disso o ácido fítico pode complexar-se e diminuir a biodisponibilidade dos nutrientes da dieta, durante a digestão, comprometendo o desempenho dos animais.

A molécula de mio-inositol hexaquisfosfato pode ter até 12 cargas negativas, sendo 2 cargas localizadas em cada um dos 6 grupos fosfato da molécula (Quirrenbach et al., 2009). A presença dos grupamentos fosfato proporciona ao fitato complexar-se à proteína e cátions bivalentes e o número de cargas iônicas no fosfato de mio-inositol influencia a capacidade complexante e a desprotonação dos grupos fosfatos depende do pH no qual a molécula se encontra. Estes complexos são formados principalmente em pH neutro e básico, pois em pH ácido a protonação parcial ou total do ácido fítico diminui sua capacidade de ligar-se com minerais catiônicos sendo que os bivalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) são mais susceptíveis (Maga, 1982; Kornegay, 2001).

O que acontece com a molécula de fitato durante o processo digestivo dos animais não ruminantes foi relatado por Maenz (2001) e ocorre da seguinte forma: à medida que o fitato passa pelo trato gastrointestinal, o pH se torna progressivamente maior, mais prótons começam a se dissociar dos grupos fosfato e, assim, a carga líquida negativa da molécula de fitato aumenta. Consequentemente, a afinidade do fitato para quelatar com cátions aumenta à medida que a molécula viaja ao longo de todo trato gastrointestinal. Após a quelação com minerais catiônicos, é formado um complexo de fitato mineral insolúvel e estável, tornando a molécula de mineral e de fitato não disponível para a digestão.

Em estudo realizado primeiramente por Cowieson et al. (2004), foi demonstrado claramente através da excreção de sódio que houve uma diminuição da presença desse mineral nas excretas quando as dietas foram suplementadas com fitase, chegando a conclusão que a presença do fitato interagem com Na aumentando a excreção do mesmo. Nesse contexto, Dilworth et al., (2005) relataram que a presença do ácido fítico deprime a atividade da bomba de sódio em ratos, tal fator foi associado após a verificação de níveis de glicose no sangue destes animais. Além disso, Liu et al., (2008) relataram que houve um aumento das concentrações de bomba de sódio e glicose nos enterócitos duodenais e jejunaes de galinhas quando houve a suplementação de fitase nas dietas. Assim, em estudo realizado por Truong et al., (2014) foi proposto que a presença de fitato impede a absorção de glicose por agir na funcionalidade da bomba de sódio e potássio.

A molécula de ácido fítico pode estar envolvida também nos processos digestivos do amido, em estudo realizado por Truong et al. (2015a) observou-se que a suplementação ou não de fitase, a taxa de desaparecimento do amido foi significativamente diferente entre os tratamentos, demonstrando assim que a presença de fitato pode influenciar negativamente a digestão do amido, os autores sugerem que o amido sofre a ação do fitato, no entanto há poucas evidências para sustentar a existência de complexos diretos de fitato e amido.

Acredita-se que a molécula de ácido fítico quando presente nas dietas pode diminuir a eficiência de enzimas endógenas acarretando em baixo aproveitamento dos nutrientes. A α -amilase pode ter sua ação inibida pelo fitato, por se complexar com íons de cálcio requeridos para a atividade enzimática (Cawley & Mitchell, 1968). Outras enzimas que podem ser afetadas são as pepsinas e as tripsinas, tal fato pode ocorrer após haver uma alteração na configuração proteica, diminuindo assim a metabolização desses nutrientes e influenciando negativamente a energia metabolizável da ração (Singh & Krikorian, 1982). As enzimas endógenas sacarase e a maltase também reduz sua ação digestiva na presença de fitato (Dersjant-Li et al., 2015).

O ácido fítico apresenta ainda a capacidade de complexar-se às proteínas da digestão, agindo como fator antinutricional. Esta capacidade ocorre tanto em pH ácido quanto em alcalino e neutro, promovendo o decréscimo da solubilidade destas e eventualmente a redução de sua utilização (Cheryan, 1980). Complexos fitato-mineral-proteína são de difícil digestão o que dificulta a assimilação da proteína (Ravindran et al., 1999). Apesar da capacidade da fitase em complexar-se a essas moléculas em

variados pH, o meio ácido diminui essa capacidade, pois nesta faixa de pH o fitato pode protonar parcial ou totalmente diminuindo a eficiência de se ligar às moléculas catiônicas como os minerais por exemplo.

Além de causar baixa digestibilidade dos nutrientes, o alto conteúdo de ácido fítico nas fezes dos animais causa poluição ambiental devido à alta liberação de fósforo orgânico no solo ou na água seguida pela degradação por microrganismos que ali estão presentes (Gargova et al., 1997).

Ação das fitases

Conhecendo a molécula de ácido fítico e as características antinutricionais que o mesmo pode ocasionar na dieta dos não ruminantes, a adição da enzima fitase pode neutralizar tais efeitos melhorando a disponibilidade do fósforo e evitando que o fitato complexa aos outros nutrientes da dieta. Cada enzima atua de forma diferente, porém o intuito é o mesmo entre as classes utilizadas na indústria.

Historicamente o uso de fitase exógena em dieta de não ruminantes visava a disponibilidade de fósforo provinda da molécula de fitato diminuindo a excreção deste mineral no meio ambiente, assim como a suplementação de fontes inorgânicas à dieta, no entanto, sabe-se que existe uma ação extra fosfórica da enzima fitase observada durante o processo digestivo dos animais que possibilita a adição destas enzimas nas dietas com intuito de melhorar a digestibilidade de minerais, aminoácidos e energia (Selle & Ravindran, 2008), contribuindo ainda com a ação de enzimas endógenas essenciais no metabolismo (Liu et al., 2009), elevação das concentrações de carotenoides hepáticas, α -tocoferol, retinol e coenzima Q10 (Karadas et al., 2010; Liu et al., 2008). Pode interferir aumentando a sensibilidade do receptor de insulina do fígado de frango inibindo a expressão do gene do fator 1 de crescimento semelhante à insulina (Józefiak et al., 2010). Além disso, em frangos de corte saudáveis, a fitase aumentou a proliferação de linfócitos sanguíneos e níveis de IgA intestinal e células T citotóxicas (Liu et al., 2008).

A atividade da fitase é expressa como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 micromol de fosfato inorgânico (IP) por minuto de um excesso de fitato de sódio (0,0051 mol/L), em pH 5,5 e à temperatura de 37 °C, expresso em unidades de fitase (*Unit of phytase activity* – FTU) (Engelen et al., 1994). Teoricamente, a hidrólise enzimática completa do fitato gera uma série de fosfatos de mio-inositol menores (IP6 \rightarrow IP5 \rightarrow IP4 \rightarrow IP3 \rightarrow IP2 \rightarrow IP1), por meio de uma cadeia de reações de

desfosforilação, para produzir o mio-inositol e seis P inorgânicos. Entretanto, o mecanismo de catálise e o grau de desfosforilação do ácido fítico são variáveis, pois dependem de diferentes tipos de fitases (Greiner et al., 2002).

Estudos relatam que há uma maior probabilidade que a moela seja o local de maior degradação do IP6 (Truong et al., 2017); é o que também relatam Walk et al. (2014), quando utilizou 500 FTU/kg de fitase e após análise detectou uma degradação de 94,7% nas concentrações de IP6. Estes resultados correlacionavam com o máximo ganho de peso dos animais. Já Zeller et al. (2015a) relataram que o proventrículo e a moela foram os principais locais de degradação de IP6, alcançando uma degradação de 91,5%, uma vez que suplementou uma fitase bacteriana de *E. coli*.

A 3-fitase C.E. 3.1.3.8. inicia a hidrólise do fitato no terceiro grupamento fosfato, formando uma nova molécula de 1D-mio-inositol 1,2,4,5,6-pentaquisfosfato mais uma molécula de fosfato (Figura 02).

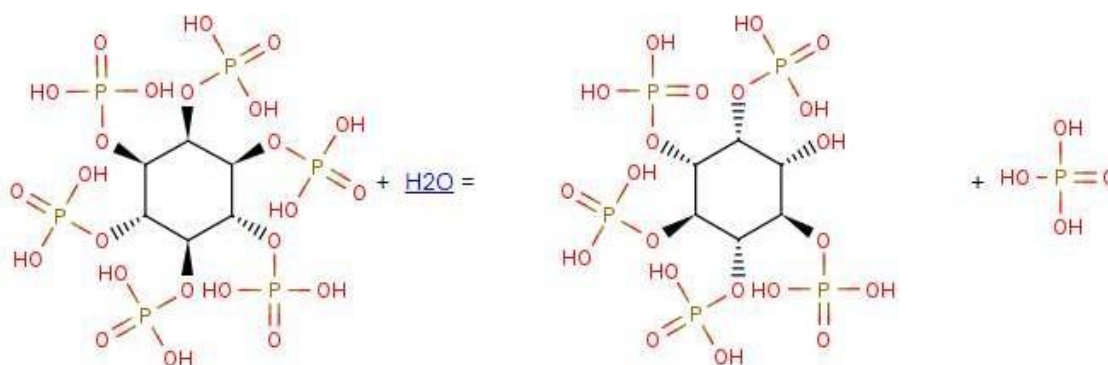


Figura 02 – Reação de hidrólise do ácido fítico realizada por uma fitase (C.E. 3.1.3.8). (Fonte: Brenda, 2017)

A 4-fitase, também conhecida como 6-fitase C.E. 3.1.3.26, inicia o processo de hidrólise no quarto grupamento fosfato, gerando duas novas moléculas sendo uma 1D-mio-inositol 1,2,3,5,6-pentaquisfosfato mais uma molécula de fosfato (Figura 03). O produto também pode ser designado como 1L-mio-inositol 1,2,3,4,5-pentaquisfosfato quando a numeração 1L é aplicada. Portanto, a enzima é frequentemente chamada de 6-fitase.

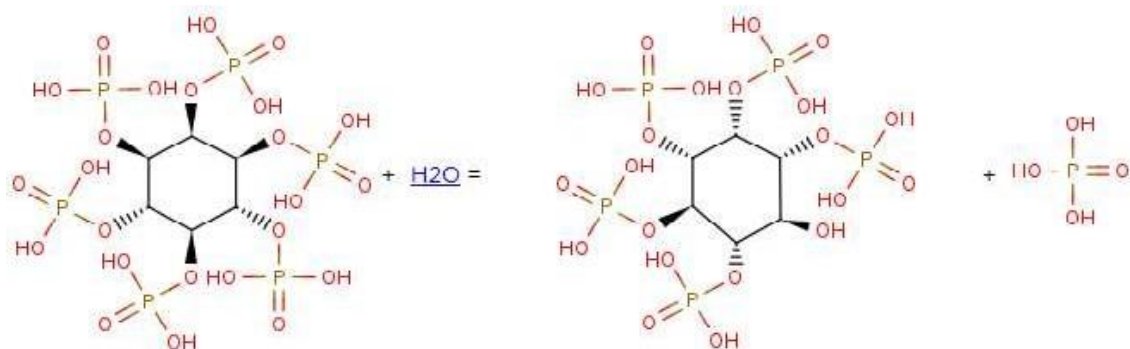


Figura 03 – Reação de hidrólise do ácido fólico realizada por uma fitase (C.E. 3.1.3.26).

(Fonte: Brenda, 2017)

A 5-fitase C.E. 3.1.3.72, inicia a hidrólise do fitato no quinto grupamento fosfato, dando origem a duas novas moléculas a 1L-mio-inositol 1,2,3,4,6-pentaquisfosfato e um fosfato (Figura 04).

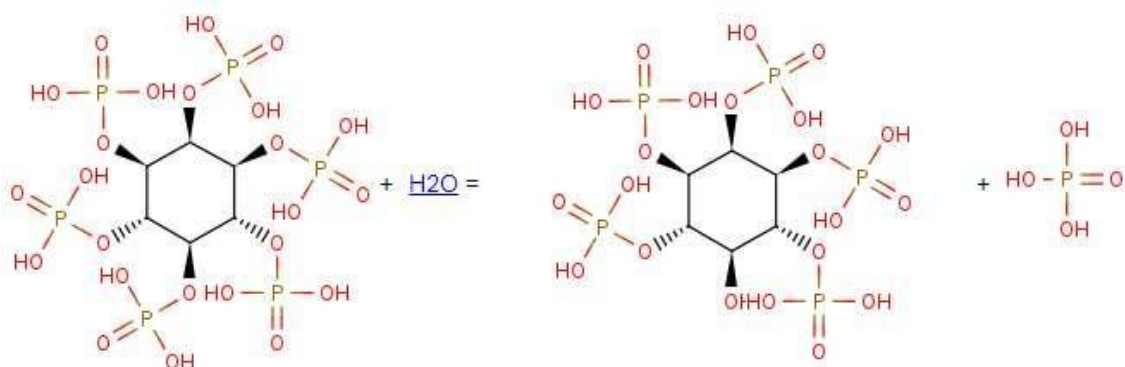


Figura 04 – Reação de hidrólise do ácido fólico realizada por uma fitase (C.E.

3.1.3.72). (Fonte: Brenda, 2017)

Para que a atividade enzimática seja efetivada, estas devem atuar de forma precisa em variadas faixas de pH e temperatura, resistir a ação de possíveis inibidores e principalmente à ação de enzimas endógenas, em particular, as proteases (Chen et al., 2015), outro ponto a ser observado é a origem dos microrganismo e as condições de processamento às quais serão submetidas, como tempo, temperatura e umidade (Cowieson et al., 2011). Alguns autores relatam que as enzimas derivadas de bactérias são mais resistentes à proteólise da pepsina, da tripsina e da quimotripsina e, portanto, permanecem estáveis e ativas no trato gastrointestinal por mais tempo (Kumar et al., 2003; Morales et al., 2011).

A ação das fitases pode ser prejudicada por uma dieta mal balanceada, tendo em vista que o pH do trato gastrointestinal influencia diretamente na ação enzimática. Uma relação inadequada de cálcio e fósforo inibe a fitase e evidencia a ação antinutricional do fitato. Nelson et al. (1964) relataram que altos níveis de cálcio na dieta a pH 6,0 promovem a reação de cálcio com ácido fítico, resultando em fitato de cálcio, que precipita e não pode ser quebrado por fitase, reduzindo a biodisponibilidade do fósforo.

Aplicações práticas e eficiência da utilização de fitase em dietas de aves

O surgimento de leis que visavam reduzir a poluição ambiental proveniente da produção animal impulsionou os estudos voltados para o desenvolvimento de alternativas nutricionais que reduzissem a excreção de fósforo. Nesse contexto, verificou-se que a maior quantidade de fósforo presente na alimentação de não ruminantes estava indisponível aos animais, por não haver enzimas suficientemente que atuassem na digestão, passando por todo trato gastrointestinal e sendo excretado via fezes. Assim, surgiram os estudos com intuito de diminuir esta excreção.

Possivelmente, Warden e Schaible (1962) foram os primeiros a mostrar que a fitase exógena aumenta a utilização de fósforo contido na molécula de fitato e mineralização óssea em pintinhos. Nelson et al. (1971) mostrou que a suplementação dietética de fitase microbiana pode efetivamente melhorar a disponibilidade de fósforo no animal. Estes autores descobriram que a suplementação de uma fitase derivada de *Aspergillus ficuum* em uma dieta de milho e farelo de soja melhorou significativamente o desempenho de pintinhos, a cinza óssea e a digestibilidade de fósforo. A partir desses estudos iniciou-se o desenvolvimento de enzimas para atuar na hidrólise do fitato com posterior liberação do fósforo e absorção pelos animais. Mais tarde iniciou-se a produção industrial da fitase.

Atualmente a enzima fitase vem sendo utilizada em grande escala na nutrição de aves. A diminuição da excreção de fósforo juntamente com a eficiência alimentar que esta enzima propõe, fez com que houvesse uma alta demanda do produto nos setores de nutrição animal, proporcionando o crescimento industrial e a fabricação destes aditivos tornando-lhes atraentes e acessíveis aos produtores. É o que afirma Bertechini (2006) quando relata que o desenvolvimento biotecnológico permitiu que se produzissem enzimas altamente especializadas e com objetivos importantes para complementação das enzimas digestivas endógenas produzidas no trato digestório dos animais. Os

ingredientes vegetais possuem fatores antinutricionais e/ou substâncias que não são normalmente digeridas pelas enzimas endógenas e o uso de enzimas exógenas específicas permite a melhoria do aproveitamento destes compostos.

No início procurava-se diminuir a excreção de fósforo assim como reduzir a suplementação de fontes inorgânicas deste mineral tornando-lhe disponível após ação da fitase à molécula de ácido fítico. Esta aplicabilidade ficou bastante elucidada nos estudos voltados a nutrição animal utilizando a fitase (Waldroup et al., 2000; Ravindran et al., 2000; Viveros et al., 2002). Com relação aos níveis de recomendação da suplementação da fitase verifica-se que os níveis variam de 100 a 600 FTU/kg de ração para poedeiras comerciais, dependendo dos ingredientes usados, da matriz enzimática e idade da ave. Em aves pós muda, Vieira et al. (2001) utilizaram dois tipos de rações (ração 1 - milho, farelo de soja, farelo de arroz e farelo de trigo; ração 2 - milho e farelo de soja) para poedeiras leves e recomendam 100 FTU/kg de ração, segundo os autores a suplementação da fitase melhorou a produção de ovos, os índices de Unidade Haugh (qualidade interna dos ovos) e o peso específico do ovo. Já Casartelli et al. (2005) avaliaram três fontes de fósforo e inclusão ou não de fitase (0 e 1000 FTU/kg) para poedeiras Hysex Brown. Os autores relataram melhorias na qualidade de casca, porcentagem e gravidade específica dos ovos quando a fitase foi adicionada em rações de poedeiras recebendo 1000 FTU/kg de ração, a suplementação de fitase reduziu a excreção de fósforo, cálcio e nitrogênio, mas afetou o peso dos ovos no pico de produção.

Em estudo realizado por Viana et al. (2009) avaliaram o desempenho e metabolismo de poedeiras comerciais no período de 24 a 36 semanas de idade em cinco dietas: controle positivo; controle negativo (CN) com 0,15% de fósforo disponível; CN + 200 FTU de fitase; CN + 400 FTU de fitase; CN + 600 FTU de fitase. Os autores verificaram que a adição da enzima fitase (200, 400 e 600 FTU) proporcionou produção de matéria orgânica e conversão por massa de ovo semelhante àquelas alimentadas com a ração controle positivo e que a adição de 600 FTU de fitase melhora o metabolismo dos nutrientes da dieta em poedeiras comerciais.

Novos conceitos voltados para a utilização das enzimas fitases vêm surgindo baseada na ação das mesmas em disponibilizar fósforo provindo da molécula de fitato, assim como melhorar a produtividade dos animais com o efeito extra fosfórico e o conceito de superdose de fitase que tendem a inibir fatores antinutricionais causados

pela molécula do ácido fitico, melhorando assim a disponibilidade de nutrientes e a eficácia dos processos digestivos e metabólicos.

Os efeitos extra fosfórico de superdoses de fitase são benefícios resultantes de mais do que apenas um aumento na disponibilidade de fósforo e pode ser o resultado de mudanças que ocorrem no intestino e a saúde geral do animal. O aumento da hidrólise de fitato pode melhorar o desempenho geral e a eficiência da utilização de nutrientes, aumentando assim a eficiência da produção para os avicultores (Beeson et al., 2017).

Baseado no conceito de superdosagem de fitase Santos et al. (2008) avaliaram os efeitos da suplementação de fitase (0, 300, 1200, 2400, 3600 FTU/kg de ração) em dietas com diferentes valorizações nutricionais para poedeiras semi-pesadas com 26 semanas de idade. Os resultados obtidos mostram que a suplementação com fitase em dietas valorizadas não influenciaram a produção de ovos, conversão alimentar, peso médio dos ovos, perda de ovos, porcentagem da casca, espessura da casca e porcentagem relativa do peso do ovo armazenado por 7 dias em relação ao peso do ovo fresco, mesmo no nível de menor nível de suplementação da enzima (300 FTU/kg de ração). Da mesma forma os autores informam que uma redução mais acentuada na densidade nutricional (65 Kcal/EM, 4% proteína bruta, 3,5% aminoácidos digestíveis, 0,15 (4%) cálcio e 0,18 (51%) fósforo disponível de dietas para poedeiras semi-pesadas no pico de produção pode ser efetuada com a suplementação maior ou igual a 1200 FTU da fitase avaliada, sendo suficiente para um bom desempenho e qualidade externa dos ovos, se comparando com a dieta controle (com níveis nutricionais usualmente utilizados).

Estudo realizado por Cowieson et al. (2006) verificaram que a ação do ácido fitico pode reduzir a metabolização do nitrogênio provindo da caseína e reduzir a digestibilidade dos aminoácidos. Liu et al. (2009) avaliaram a presença de fitato em diferentes concentrações e a suplementação da fitase em níveis crescentes de FTU em dietas para aves. Os autores verificaram o efeito antinutricional do fitato nas secreções e atividades das enzimas endógenas dos frangos de corte, sendo que o nível maior de fitato diminuiu a atividade da tripsina e da pepsina estando a ação destas recuperadas com a adição de fitase. Neste estudo, ainda foi demonstrado interações significativas entre fitato e fitase nas expressões de mRNA de grelina, somatostatina e S6K no jejuno. Os resultados sugerem que o fitato e a fitase podem influenciar o sistema gastrointestinal endócrino e exócrino, bem como a rede regulatória periférica de

crescimento em frangos de corte. Os resultados descritos demonstram que a ação da fitase vai além da liberação do fósforo da molécula de ácido fítico.

O fitato é capaz de ligar-se diretamente à pepsina ou ao peptídeo que ativa esta enzima (Yu et al., 2012). Morgan et al. (2016) verificaram que a ação da pepsina aumentou significativamente quando houve adição de fitase nas dietas, sugerindo assim que a fitase tem ação direta na atividade enzimática desta proteólise endógena. O fitato pode influenciar negativamente na utilização das proteínas e absorção de aminoácidos por ser um potente agente quelatante devido a suas cargas negativas reagirem com as cargas positivas de alguns aminoácidos (lisina, arginina, histidina) inibindo ainda a ação de pepsina, tripsina e α -amilase (Lehnen et al., 2011; Walk et al., 2012).

No intuito de avaliar a relação da suplementação de fitase com a digestibilidade de aminoácidos, Pirgozliev et al. (2011) estudaram doses elevadas de fitase bacteriana com 500 e 1250 FTU/kg para frangos de corte de 7 a 17 dias de idade. Os autores concluíram que a dieta suplementada com 1250 FTU obteve 64% de melhoria significativa no coeficientes de digestibilidade total e de aminoácidos total em comparação com o controle negativo. Entre os aminoácidos, o impacto da fitase foi mais pronunciada para a treonina, um componente importante da mucina gastrointestinal, do que para outros aminoácidos.

A capacidade que o ácido fítico possui em reduzir a digestibilidade de aminoácidos pode ser demonstrado também para minerais, como relata Singh (2008). O autor afirma que o fitato pode se complexar com inúmeros cátions bivalentes (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} e Ca^{2+}) tornando-os biologicamente indisponíveis para os monogástricos. Quando se utiliza a suplementação de fitase exógena vários desses cátions podem ser novamente disponibilizados. Em estudo realizado por Liu et al. (2015) foi proposto uma redução nos níveis de fósforo, cálcio, sódio, energia e certos aminoácidos (lisina, metionina, metionina+cisteína, treonina e arginina) com a suplementação ou não de 500 e 1000 FTU/kg de uma enzima fitase bacteriana (*Buttiauxella*). Os autores detectaram resultados relevantes com a adição da fitase em ambos os níveis melhorando significativamente as taxas de digestão de nitrogênio. Além disso, a fitase proporcionou uma maior retenção de cálcio, fósforo e sódio. Nesse estudo o nível máximo de enzima utilizada (1000 FTU/kg) apresentou resultados satisfatórios sobre o desempenho dos animais. Foi proposto por Truong et al. (2017) que a maior capacidade de degradação do fósforo e do cálcio das dietas ocorre quando estes minerais estão em baixa concentração pelo fato de não haver uma alta formação de

complexo fitato-cálcio favorecendo assim a ação enzimática liberando o fósforo presente no ácido fítico. Resultados semelhantes foram relatados por Sousa et al. (2015).

O teor de cálcio na dieta pode influenciar negativamente a utilização de fósforo, particularmente o fósforo fítico, devido à formação de complexos insolúveis com cálcio no trato digestório, contrariando o efeito da fitase, que não é capaz de hidrolisar tais complexos (Leeson et al., 1996). A presença de cálcio nas dietas pode ainda estar influenciando o aumento do pH intestinal e assim minimizando a ação enzimática (Selle et al., 2009).

De acordo com Nelson & Walker (1964) e Pereira et al. (2012), o conteúdo de cinzas ósseas é o parâmetro mais eficiente para estimar a quantidade de fósforo liberada pela fitase em dietas à base de milho e farelo de soja. Com o objetivo de avaliar a influência da redução de nutrientes e energia em dietas suplementadas com fitase sobre o desempenho, pH gastrointestinal, composição de órgãos e ossos e a bioquímica do sangue de frangos entre 8 e 21 dias de idade, Sousa et al. (2015) relataram que a concentração de cinzas nas tíbias dos frangos foi significativamente maior. Morgan et al. (2016) corroboram os resultados de Sousa et al. (2015). Estes autores verificaram uma maior concentração de cálcio e fósforo nas tíbias e fêmures de frangos de corte que receberam fitase nas dietas, no entanto, foi observado que a além do fornecimento da fitase a concentração destes minerais podem ser afetadas pela disponibilidade do fitato.

Walk et al. (2013) avaliaram o desempenho e o teor de cinzas na tíbia de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade recebendo sete dietas: controle positivo (CP) com as recomendações nutricionais; CP com cálcio e fósforo excedendo as recomendações nutricionais em 0,10%; CP com suplementação de 500 FTU/kg de fitase *E. Coli*; controle negativo (CN) com cálcio e fósforo reduzidos em 0,16 e 0,15% da recomendação nutricional, respectivamente; CN com suplementação de 500, 1000 e 1500 FTU/kg de ração. Em todas as fases, a dieta que proporcionou melhores resultados de desempenho aos animais foi a CN + 1500 FTU/kg de ração. De 1 a 21 dias de idade os maiores teores de cinza ocorreram na dieta controle positivo com excesso de cálcio e fósforo. Os autores sugerem que alguns destes melhoramentos do desempenho, na cinza de osso, aminoácidos, e no metabolismo de energia com a suplementação de maior teor de fitase pode estar associado a hidrólise de fitato, reduzindo o efeito quelante antinutricional do fitato liberando o fósforo.

Em estudo conduzido por Walk et al. (2014) verificou-se após suplementação de fitase que os teores de cinzas dos ossos das aves foram significativamente diferentes entre os tratamentos que receberam ou não a enzima, os autores justificam que a fitase age liberando fósforo da molécula de ácido fítico tornando este mineral provindo dos vegetais disponível. Juntamente com esta variável foi observado que a adição da enzima proporciona melhoria na conversão alimentar, e em conclusão os autores afirmam que a superdosagem de 1500 FTU/kg proporcionou resultados satisfatório sendo atribuído à disponibilidade do mio-inositol provindo do fitato após o uso da fitase. Manobhavan et al. (2016) avaliaram o efeito da superdosagem de fitase (500, 2500 e 5000FTU/kg de ração) em dietas com redução de fósforo para frangos de corte. Os autores mostraram que superdoses fitase (2500 e 5000 FTU/kg) na dieta com baixo fósforo, aumentou o ganho de peso corporal, aumentou a digestibilidade ileal de aminoácidos (serina e ácido aspártico) e minerais (cálcio e fósforo), assim como os níveis de fósforo no sangue e os minerais ósseos tais como cálcio, fósforo, magnésio e zinco. Desta forma, doses elevadas de fitase na dieta com baixo nível de fósforo foram benéficas em relação a dose padrão (500 FTU/kg) de fitase na dieta de frangos de corte.

Outros parâmetros podem ser relacionados à absorção e deposição de fósforo e cálcio aos ossos dos animais. Nesse contexto Zeller et al. (2015b) trabalharam com suplementação de fitase em dietas de frangos de corte e avaliaram diversos parâmetros ósseos, como conteúdo cortical, resistência a ruptura e concentração de cinzas ósseas. Os autores verificaram que a inclusão de fitase proporcionou melhores resultados para estas variáveis, uma dosagem de 500 FTU/kg e uma superdose de fitase de 12,500 FTU/kg possibilitaram tais resultados. Estas variáveis podem ser melhoradas pela ação da enzima fitase no metabolismo em degradar a molécula de fitato e disponibilizar o mio-inositol. Isso pode estar relacionado com a interação de diferentes compostos de fósforo participarem da mineralização óssea (Żyła et al., 2013). Tal processo também foi afirmado por Suzuki et al., (2010) sobre a participação do trifosfatos de mio-inositol na via de sinalização de cálcio.

A formação da casca do ovo de poedeiras está diretamente relacionada com o metabolismo dos minerais cálcio e fósforo. Em estudo realizado por Englmaierová et al. (2015) com galinhas poedeiras Lohmann Brown de 38 semanas, verificou-se que a inclusão de níveis crescentes de fitase produzidas por *Aspergillus niger* em dietas com redução nos níveis de fósforo não fítico, uma das variáveis que obteve resultados satisfatórios com baixo fósforo e suplementação de fitase foi a qualidade de casca dos

ovos. Englmaierová et al. (2017) trabalhou com aves mais velhas (60 semanas) e obtiveram resultados semelhantes nas variáveis de qualidade de casca.

Quando presente na dieta a molécula de ácido fítico está ainda associada a uma maior excreção de sódio via excreta (Cowieson et al., 2004), tendo em vista a grande relação deste mineral com o metabolismo, é necessário neutralizar a ação do fitato e reduzir a excreção do sódio. Um dos prejuízos causados por alta excreção de sódio pode ser demonstrado na funcionalidade da bomba de sódio e potássio e em estudo realizado por Dilworth et al. (2005) foi relatado o detrimento da atividade da bomba de sódio quando os animais foram submetidos a dieta contendo ácido fítico. Estes resultados foram sugeridos após a verificação dos níveis de glicose no sangue dos animais. Em estudo conduzido por Liu et al. (2008) verificou-se que houve um aumento nas concentrações de bombas de sódio e glicose nos enterócitos duodenais e jejunais de galinhas que foram alimentadas com dietas contendo a enzima exógena fitase. Assim, no trabalho realizado por Truong et al. (2014) foi proposto que a presença de fitato impede a absorção de glicose por agir na funcionalidade da bomba de sódio e potássio.

Foi demonstrado por Truong et al. (2015b) que a fitase proporciona uma melhor retenção de sódio e juntamente foi observado a melhora na digestibilidade de 16 aminoácidos após análise do conteúdo da digesta localizados no jejuno proximal das aves. Os autores sugerem que a maior retenção de sódio tem relevância na digestão de aminoácidos e na absorção da glicose. Nesse contexto, Truong et al. (2017) confirmaram a maior reabsorção de sódio ao longo do intestino delgado, quando utiliza-se fitase nas dietas, aumentando a disponibilidade deste mineral para co-transporte de nutrientes conduzidos pela bomba de sódio. Neste trabalho o nível de 2000 FTU/kg de fitase proporcionou uma melhora no ganho de peso dos animais quando a enzima foi suplementada ao controle negativo.

Considerações finais

- A produção de fitase a nível comercial ocorre basicamente de duas maneiras, sendo por fermentação submersa ou fermentação em estado sólido. Ambos os processos são precisos na elaboração de enzimas porém os custos de produção são variáveis implicando assim na escolha das empresas.
- As fitases podem ser provenientes de várias espécies como animais plantas e microrganismos, no entanto, as enzimas fitases destinadas à alimentação

de aves são provenientes de microrganismos e estes podem ser fungos, bactérias ou leveduras. As bactérias são as mais utilizadas na fabricação das enzimas.

- Existem três formas de classificar as enzimas fitases, de acordo com o local de iniciação da desfosforilação do fitato, o mecanismo catalítico ou pela atividade de pH. Estas enzimas possuem especificidade na hidrólise do fitato que proporciona o início do processo de fosforilação.

- Os estudos demonstram a ação das fitase no substrato fitato e relaciona uma série de fatores que possibilita a inclusão destas enzimas exógenas na alimentação de aves. A disponibilidade de fósforo presente no fitato deixou de ser o único motivo de utilização das enzimas, tendo em vista que a ação extra fosfórica das mesmas possibilitam uma melhor digestibilidade dos aminoácidos e proteínas, assim como uma melhor expressão de enzimas endógenas envolvidas no metabolismo proteico e energético. A enzima fitase ainda possui relação com o uso de minerais como o cálcio e sódio e na liberação das moléculas de mio-inositol que estarão contribuindo com os processos fisiológicos e metabólicos dos organismos das aves neutralizando efeitos anti nutricionais dos fitatos e possibilitando desempenhos produtivos satisfatórios verificados em inúmeras variáveis nos experimentos.

- A crescente demanda do produto possibilitou os avanços industriais e o fornecimento de enzimas em preços acessíveis aos produtores que conseqüentemente diminuirão seus custos de produção.

- Por fim, a enzima permite uma maior disponibilidade de fósforo que antes não eram aproveitados pelos animais, proporcionando menor suplementação de fósforo não fitico, diminuindo a excreção deste mineral no ambiente e reduzindo a poluição.

Referências Bibliográficas

- Alonso, F. O. M 2001. 'Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)'. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro*. pp 139.
- Beeson, L.; Walk, C.L.; Bedford, M.R.; Olukosi, O.A 2017, 'Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance nutrient utilization of broilers with regular or superdoses of phytase', *Poultry Science*, vol. 96, pp. 2243-2253.
- Bertechini, A,G 2006. 'Nutrição de monogástricos', *Lavras: Ed. UFLA*, p. 301.
- Bhavsar, K, Buddhiwant, P, Soni, S,K, Depan, D, Sarkar, S, & Khire, J,M 2013 'Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: biochemical characterization and their correlation with submerged phytases', *Process Biochem*, vol. 48, pp. 1618–1625.
- Casartelli, E,M, Junqueira, O,M, Laurentiz, A,C, Filardi, R,S, Lucas Júnior, J & Araujo, L,F 2005 'Effect of phytase in laying hen diet whith different phosphorus sources', *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, vol. 7(2), pp. 93-98.
- Casey, A, & Walsh, G 2004 'Identification and Characterization of a phytase of potential commercial interest', *Journal of Biotechnology*, vol. 110, pp. 313–322.
- Cawley, R,W, & MITCHELL, T,A 1968 'Inibition of wheat alpha-amylase by bran phytic acid. Journal of the Sciences of Food and Agriculture', *Whashington*, vol. 19, no. 2, pp. 106-110.
- Champe, B,C 1989 'Enzimas. In: CHAMPE, B.C.; HARVEY, R.A. *Bioquímica ilustrada*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, pp. 53-66.
- Chen, W, Ye, L, Guo, F, Lv, Y, & Yu, H 2015, 'Enhanced activity of an alkaline phytase from *Bacillus subtilis* 168 in acidic and neutral environments by directed evolution' *Biochemical Engineering Journal*, vol. 98, pp. 137-143.
- Cheryan, M 1980, 'Phytic acid interactions in food systems' *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol.13, no.4, pp. 297-335.
- Chu, H,M, Guo, R,T, Lin, T,W, Chou, C,C, Shr, H,L, Lai, H,L, Tang, T,Y, Cheng, K,J, Selinger, B,L, & Wang, A,H,J 2004, 'Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: dsp phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis'. *Structure* vol. 12, pp. 2015–2024.
- Cosgrove, D, J 1963 'The isolation of myoinositol pentaphosphates from hydrolysates of phytic acid', *Biochemical Journal*, vol. 89, no. 1, pp. 172-175.
- Couto, S, & Sanroman, M 2006 'Application of solid-state fermentation to food industry – a review', *Journal of Food Engineering*, vol. 76, no. 3, pp. 291-302.
- Cowieson, A, J, Acamovic, T, & Bedford, M,R 2006, 'Phytic acid and phytase: Implications for protein utilization by poultry', *Poultry Science*, vol. 85, pp. 878–885.
- Cowieson, A, J, Wilcock, P, & Bedford, M, R 2011, 'Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics', *World's Poultry Science Journal*, vol. 67, no. 02, pp. 225–236.
- Cowieson, A,J, Acarnovic, T, & Bedford, M,R 2004, 'The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens', *British Poultry Science*, vol. 45, pp. 101-108.
- Dersjant-li, Y, Awati, A, Schulze, H, & Partridge, G 2015, 'Phytase in nonruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 95, pp. 878-896.

Dilworth, L, L, Omoruyi, F, O, & Asemota, H, N 2005, 'Digestive and absorptive enzymes in rats fed phytic acid extract from sweet potato (*Ipomoea batatas*)', *Diabetologia Croatica*, vol.34, no. 2, pp. 59–65.

Ellaiah, P, Prabhakar, T, Ramakrishna, B, Thaer Taleb, A, & Adinarayana, K 2004, 'Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*', *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 5, pp. 525-528.

Engelen, A, J, Vanderheeft, F, C, Randsdorp, P, H, G, & Smit, E, L, C 1994, 'Simple and rapid-determination of phytase activity', *Journal of AOAC International*, vol. 77, pp. 760-764.

Englmaierová, M, Skřivan, M, Skřivanová, E, & Čermák, L 2017, 'Limestone particle size and *Aspergillus niger* phytase in the diet of older hens', *Italian Journal of Animal Science*, vol. 16, pp. 608-615.

Englmaierová, M, Skřivan, M, Skřivanová, E, Bubancová, I, Čermák, L, & Vlčková, J 2015, 'Effects of a low-phosphorus diet and exogenous phytase on performance, egg quality, and bacterial colonisation and digestibility of minerals in the digestive tract of laying hens', *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 60, pp. 542-549.

Erdman, J, W 1979, 'Oilseed phytates - nutritional implications', *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 56, pp. 736-741.

Feitosa, I, C 2009 'Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa', *Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju*, pp. 104.

Fu, S, Sun, J, & Qian, L 2008, 'Effect of Ca²⁺ on beta-propeller phytases', *Protein and Peptide Letters*. vol. 15, no. 1, pp. 39-42.

Gargova, S, Roshkova, Z, & Vancheva, G 1997 'Screening of fungi for phytase production', *Biotechnology Techniques*, vol. 11, no. 4, pp.221-224.

Gautier, A, E, Walk, C, L, & Dilger, R, N 2018, 'Effects of a high level of phytase on broiler performance, bone ash, phosphorus utilization, and phytate dephosphorylation to inositol', *Poultry Science*, vol. 97, no.1, pp. 211–218.

Gerhartz, W 1990 'Enzymes in industry: production and applications'. *New York: VHC Publishers*, pp. 321.

Greiner, R, Farouk, A, Alminger, M, L, & Carisson, N 2002, 'The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus spp*', *Canadian Journal of Microbiology*. vol. 48, no.11, pp.986-994.

Gunashree, B,S, & Venkateswaran, G 2008, 'Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations', *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 35, pp.1587–1596

Ha, N, C, Oh, B, C, Shin, S, Kim, H, J, Oh, T, K, Kim, Y, O, Choi, K, Y, & Oh, B, H 2000, 'Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states', *Nature Structural Biology*, vol. 7, pp. 147–153.

Hegeman, C, E, & Grabau, E, A 2001 'A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings', *Plant Physiology*, vol. 126, pp. 1598–1608.

Józefiak, D, Ptak, A, Kaczmarek, S, Maćkowiak, P, Sassek, M, & Slominski, B, A 2010, 'Multi-carbohydrase and phytase supplementation improves growth performance and liver insulin receptor sensitivity in broiler chickens fed diets containing full-fat rapeseed'. *Poultry Science*, vol. 89, pp. 1939–1946.

Karadas, F, Pirgozliev, V, Pappas, A,C, Acamovic, T, & Bedford, M,R 2010, 'Effects of different dietary phytase activities on the concentration of antioxidants in the liver of growing broilers', *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, vol. 94, pp. 519–526.

Kornegay, E, T 2001 'Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity', *Enzymes in farm animal nutrition*. pp. 237-271.

Kumar, V, Miasnikov, A, Sands, J, S, & Simmins, P,H 2003, 'In vitro activities of three phytases under different pH and protease challenges', *In Proceedings of the Australian Pig Science Association*, pp. 164.

Leeson, S, Caston, L, & Summers, J, D 1996 'Broiler response to energy or energy and protein dilution in the finisher diet', *Poultry Science*, vol. 75, pp. 522-528.

Lehnen, C,R, Lovatto, P,A, Andretta, I, Kipper, M, Hauschild, L, Rossi, C,A 2011, 'Meta- analise da digestibilidade ileal de aminoácidos e minerais em suínos alimentados com rações contendo enzimas', *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 46, no. 4, pp. 438-445.

Li, R, Zhao, J, Sun, C, Lu, W, Guo, C, & Xiao, K 2010, 'Biochemical properties, molecular characterizations, functions, and application perspectives of phytases', *Front Agric China*, vol. 4, pp. 195–209.

Liu, N, Ru, Y, J, Li, F, D, & Cowieson, A,J 2008, 'Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens', *Journal of Animal Science*, vol.86, pp. 3432-3439.

Liu, N, Ru, Y, J, Li, F, D, Wang, J, & Lei, X 2009, 'Effect of dietary phytate and phytase on proteolytic digestion and growth regulation of broilers', *Arch. Anim. Nutr.* vol. 63, pp. 292–303.

Liu, S, Y, Bold, R, M, Plumstead, P,W, & Selle, P, H 2015, 'Effects of 500 and 1000 FTU/kg phytase supplementation of maize based diets with two tiers of nutrient specifications on performance of broiler chickens', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 207, pp. 159-167.

Maenz, D,D 2001, 'Enzymatic and other characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds', *In: Bedford, M.R. and Partridge, G.G. eds. Enzymes in farm animal nutrition*. Wallingford, UK: CABI, pp.61-84.

Maga, J, A 1982, 'Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis', *Journal Agricultural Food Chemistry*, vol.30, no. I, pp. 1-9.

Manobhavan, M, Elangovan, A, V, Sridhar, M, Shet, D, Ajith, S, Pal, D, T, & Gowda N, K 2016, 'Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broiler fed corn-soya-based diets', *J Anim. Physiol. Anim. Nutr.* vol. 100, pp. 93–100.

Mittal, A, Singh, G, Goyal, V, Yadav, A, & Aggarwal, N, K 2012 'Production of phytase by acido-thermophilic strain of *Klebsiella* sp. DB- 3FJ711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation', *Innovative Rom.Food Biotechnol.* Vol.10, pp. 18-27.

Morales, G, A, Moyano, F, J, & Marquez, L 2011, 'In vitro assessment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 170, pp. 209- 221.

Morgan, N, K, Walk, C, L, Bedford, M, R, Scholey, D, V, & Burton, E, J 2016, 'Effect of feeding broilers diets differing in susceptible phytate content'. *Animal Nutrition*, vol. 2, pp. 33-39.

Mullaney, E, J, Gibson, D, M, & Ullah, A. H 1991, 'Positive identification of a lambda gt11 clone containing a region of fungal phytase gene by immunoprobe and sequence verification', *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol. 35, pp. 611-4.

Mullaney, E,J, & Ullah, A,H,J 2003, 'The term phytase comprises several different classes of enzymes', *Biochemical Biophysical Research Communications*, vol. 312, pp.179–184.

Nelson, T, S, & Walker, A,C 1964, 'The biological evaluation of phosphorus compounds: A summary', *Poultry Science*, vol.43, pp. 94-98.

Nelson, T, S, Shieh, T, R, Wodzinski, R, J, & Ware, J, H 1971, 'Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks', *The Journal of Nutrition*, vol. 101, pp. 1289-93.

O'dell, B, L, De Boland, A, R, & Koirtyohann, S, R 1972, 'Distribution of phytate and nutritionally important elements among morphological components of cereal grains', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 20, no. 3, pp. 718-723.

Pandey, A, Soccol, C, R, & Leon, J, A, R 2001b 'Solid-State fermentation in biotechnology: fundamentals and applications', *Asiatech Publishers*, pp 221.

Pandey, A, Szakacs, G, Soccol, C, R, Rodriguez-Leon, J, A, & Soccol, V, T 2001a, 'Production purification and properties of microbial phytases', *Bioresource technology*, vol.77, pp.203–214.

Paris, L, D 2008 'Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional', *Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo*, pp. 115.

Penz, J, R, A, M 1998, 'Enzimas em rações para aves e suínos', In: *Reunião Anual da Sociedades Brasileiras de Zootecnia, Botucatu. Anais... Botucatu, Editora São Paulo*, pp. 165-178.

Pereira, R, Menten, J, F, M, Romano, G,G, Silva, C, L, S, Zavarize, K,C, & Barbosa, N,A,A 2012, 'Eficiência de uma fitase bacteriana na liberação de fósforo fítico em rações de frangos de corte', *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 64, no. 1, pp.137-144.

Pirgozliev, V, Bedford, M, R, Acamovic, T, Mares, P, & Allymehr, M 2011, 'The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens', *British Poultry Science*, vol. 52, pp. 245-254.

Puhl, A, A, Gruninger, R, J, Greiner, R, Janzen, T, W, Mosimann, S, C, & Selinger, L,B 2007, 'Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase', *Protein. Sci*, vol. 16, pp. 1368–78.

Quirrenbach, H, R, Kanumfre, F, Rosso, N, D, & Carvalho Filho, M, A 2009, 'Comportamento do ácido fítico na presença de Fe (II) e Fe (III)', *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, vol. 29, no. 1, pp. 24-32.

Qvirist, L, Carlsson, N, G, & Andlid, T 2015, 'Assessing phytase activity– methods, definitions and pitfalls', *Journal of Biological Methods*, vol. 2, no. 1, pp. 16.

Ravindran, V, Cabahug, S, Ravidran, G, Selle, P, H, & Bryden, W, L 2000, 'Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention', *Br. Poult. Sci.* vol. 41, pp. 193–200.

Ravindran, V, Hew, L, I, Ravidran, G, & Bryden, W, L 1999, 'A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid digestibility in food ingredients for poultry', *British Poultry Science*, vol.40, no. 2, pp 266-74.

Reddy, N, R, Sathe, S, K, & Salunkhe, D, K 1982, 'Phytases in legumes and cereal', *Adv. Food Res.*, vol. 82, pp. 1-92.

Sant'anna Junior, G, L 2001, 'Produção de enzimas microbianas. In: Lima, U, A, Aquarone, E, Borzani, W, & Schmidell, W. (Coords.). Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: *Edgard Blücher Ltda.*, pp. 351- 362.

Santos, L, A, Geraldo, A, & Ferreira, C, B 2008, 'Níveis de fitase em dietas com diferentes valorizações e seus efeitos sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras semi-pesadas', *I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET. Bambuí/Bambuí/MG*.

Selle, P, H, & Ravidran, V 2007, 'Microbial phytase in poultry nutrition', *Animal Feed Science and Technology, Amsterdam*, vol. 135, no. 1/2, pp. 1-41.

Selle, P, H, & Ravidran, V 2008, 'Phytate-degrading enzymes in pig nutrition', *Livestock Science*, vol. 113, pp. 99-122.

Selle, P, H, Cowieson, A, J, & Ravidran, V 2009, 'Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs', *Livestock Science*, vol. 124, pp.126-141.

Shin, S, Ha, N, C, Oh, B, C, Oh, T, K, & Oh, B, H 2001, 'Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase', *Structure*, vol. 9, no. 9, pp. 851-858.

Silva, D, Tokuioshi, K, Martins, E, S, Silva, R, & Gomes, E 2005, 'Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3', *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 8, pp. 2885- 2889.

Singh, B, & Satyanarayana, T 2011, 'Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion', *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 17, pp. 93-103.

Singh, B, & Satyanarayana, T 2015, 'Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants', *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* vol. 99, no. 4, pp. 646-660.

Singh, M, & Krikorian, A, D 1982, 'Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate', *Jornal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 30, no. 4, pp.799-800.

Singh, P, K 2008, 'Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review', *World's Poultry Science Journal*, vol.64, pp.553-580.

Sousa, J, P, L, Albino, L, F, T, Vaz, R, G, M, V, Rodrigues, K, F, Da Silva, G, F, Renno, L, N, Barros, V, R, S, M, Kaneko, I, N 2015, 'The effect of dietary phytase on broiler performance and digestive, bone, and blood biochemistry characteristics', *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, vol.17, pp.69-76.

Spier, M, R 2005, 'Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido', *Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba*, pp 157.

Suzuki, T, Nishioka, T, Ishizuka, S, & Hara, H 2010, 'A novel mechanism underlying phytate-mediated biological action-phytate hydrolysates induce intracellular calcium signaling by a Gq protein-coupled receptor and phospholipase C-dependent mechanism in colorectal cancer cells', *Mol. Nutr. Food Res.* Vol. 54, pp. 947-955.

Truong, H, H, Liu, S, Y, & Selle, P, H 2015a, 'Phytase influences the inherently different starch digestive dynamics of wheat- and maize-based broiler diets', *Proceedings, Australian Poultry Science Symposium*, vol. 26, pp. 126-129.

Truong, H, H, Shukun, Y, Moss, A, F, Partridge, G, G, Liu, S, Y, & Selle, P, H 2017, 'Phytase inclusions of 500 and 2000 FTU/kg in maize-based broiler diets impact on growth performance, nutrient utilisation, digestive dynamics of starch, protein (N), sodium and IP₆ phytate degradation in the gizzard and four small intestinal segments', *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 223, pp.13-22.

Truong, H, H, Bold, R, M, Liu, S,Y, & Selle, P, H 2015b, 'Standard phytase inclusion in maize-based broiler diets enhances digestibility coefficients of starch, amino acids and sodium in four small intestinal segments and digestive dynamics of starch and protein', *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 209, pp. 240-248.

Truong, H,H, Yu, S, Peron, A, Cadogan, D, J, Khoddami, A, Roberts, T, H, Liu, S, Y & Selle, P, H 2014, 'Phytase supplementation of maize-, sorghum- and wheat-based broiler diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP₆) and sodium jejunal and ileal digestibility', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 198, pp. 248-256.

Tyagi, P, K, Tyagi, P, K, & Verma, S, V, S 1998, 'Phytate phosphorus content of some common poultry feed stuffs'. *Indian J. Poult. Sci.*, vol. 33, pp. 86-88.

Ushasree, M, V, Vidya, J, & Pandey, A 2014, 'Extracellular expression of a thermostable phytase (phyA) in *Kluyveromyces lactis*', *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 9, pp. 1440–1447.

Vats, P, & Banerjee, U, C 2004, 'Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview', **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 35, pp. 3-14.

Viana, M, T, S, Albino, L, F, T, Rostagno, H, S, Barreto, S, L, T, Silva, E, A, & Florentino, W, M 2009, 'Efeito da suplementação de enzima fitase sobre o metabolismo de nutrientes e o desempenho de poedeiras', *R. Bras. Zootec.* vol.38, no.6, pp 1074-1080.

Vieira, R, S, A, Bertechini, A, G, Fialho, E, T, Santos, C, D, & Teixeira, A, S 2001, 'Desempenho e qualidade de ovos de poedeiras comerciais de segundo ciclo alimentadas com rações contendo fitase', *Ciênc. agrotec.*, vol.25, no.6, pp.1413-1422.

Viveros, A, Brenes, A, Arija, I, & Centeno, C 2002, 'Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus', *Poultry Science*, vol. 81, pp.1172-1183.

Waldroup, P, W, Kersey, J, H, Saleh, E, A, Fritts, C, A, Yan, F, Stilborn, H, L, Crum, R, C, & Raboy, V 2000, 'Nonphytate phosphorus requirements and phosphate excretion of broiler chicks fed diets composed of normal or high available phosphate corn with and without microbial phytase', *Poultry Science*. vol. 79, pp. 1451–1459.

Walk, C, L, Santos, T, T, & Bedford, M, R 2014, 'Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers', *Poultry Science*, vol. 93, pp. 1172-1177.

Walk, C, L, Addo-Chidie, E, K, Redford, M, R, & Adeola, O 2012, 'Evaluation of a highly soluble calcium source and phytase in the diets of broiler chickens', *Poultry Science*, vol. 91, pp. 2255-2263.

Walk, C, L, Bedford, M, R, Santos, T, S, Paiva, D, Bradley, J, R, Wlodecki, H, Honaker, C, & McElroy, A, P 2013, 'Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase' *Poultry Science*, vol. 92, pp. 719–725.

Warden, W, K, & Schaible, P, J 1962, 'Preliminary investigations concerning utilization of phytin phosphorus by the chick', *Poultry. Science*. vol 41.

Yu, S, Cowieson, A, Gilbert, C, Plumstead, P, & Dalsgaard, S 2012, 'Interactions of phytate and *myo*-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin', *J Anim Sci*, vol. 90, pp. 1824-1832.

Zadrazil, F, & Punia, A, K 1995, 'Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi', *Bioresource Technology*, vol. 54, no.1, pp. 85-87.

Zeller, E, Schollenberger, M, Kühn, I, & Rodehutscord, M 2015a, 'Hydrolysis of phytate and formation of inositol phosphate isomers without or with supplemented phytases in different segments of the digestive tract of broilers', *J. Nutr. Sci.*, vol. 4, e1.

Zeller, E, Schollenberger, M, Witzig, M, Shastak, Y, Kühn, I, Hoelzle, L, E, & Rodehutscord, M 2015b, 'Interactions between supplemented mineral phosphorus and

phytase on phytate hydrolysis and inositol phosphates in the small intestine of broilers', *Poultry Science*, vol. 94, pp.1018–1029.

Zuo, R, Chang, J, Yin, Q, Chen, L, Chen, Q, Yang, X, Zheng, Q, Ren, G, & Feng, H 2010, 'Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics', *Microbiological Research*, vol. 165, pp. 329-335.

Żyła, K, Duliński, R, Pierzchalska, M, Grabacka, M, Józefiak, D, & Świątkiewicz, S, 2013, 'Phytases and myo-inositol modulate performance, bone mineralization and alter lipid fractions in serum of broilers', *J. Anim. Feed Sci.* vol. 22, pp. 56–62.

CAPÍTULO 2

Superdosagem de fitase bacteriana (*EC 3.1.3.26*) com redução nos níveis de aminoácidos digestíveis em dietas para frangos de corte

Superdosagem de fitase bacteriana (*EC 3.1.3.26*) em dietas com redução nos níveis de aminoácidos digestíveis em dietas para frangos de corte

Resumo: Objetivou-se avaliar a suplementação de superdosagens de fitase nas dietas com redução dos níveis de aminoácidos para frangos de corte de 1 a 45 dias sob os parâmetros de desempenho, características de carcaça, morfometria intestinal e digestibilidade ileal. Foram utilizados 1848 frangos machos da linhagem *COBB 500*, com peso inicial de $46g \pm 0,02g$ divididos em doze tratamentos, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (três matrizes nutricionais com redução de 0; 5 e 10% nos níveis dos aminoácidos metionina, lisina e treonina digestíveis) e quatro níveis de fitase (0, 500, 1500 e 3000 FTU/kg), sete repetições de vinte e duas aves por unidade experimental. Para a digestibilidade ileal foi montado um experimento a parte seguindo o mesmo desenho experimental, no entanto foram utilizados 252 animais, distribuídos em doze tratamentos, 3 repetições de 7 aves cada. Realizou-se a análise de variância dos dados e para a determinação dos níveis de FTU utilizou-se a análise de regressão. Para as matrizes nutricionais utilizou-se o teste Tukey, a 5% de probabilidade. E para as interações entre as matrizes nutricionais e os níveis de FTU foram realizados os desdobramentos. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, relata-se que é possível, após a suplementação de fitase em 1500FTU/kg, reduzir em até 10% os níveis dos três primeiros aminoácidos limitantes para frangos de corte de 1 a 45 dias sem afetar o desempenho produtivo dos animais. A superdosagem de fitase promoveu uma maior disponibilidade de fósforo e melhoria no trato digestivo das aves, aumentando a relação vilo:cripta, assim como a área do vilo. Fatores estes que são relacionados a proliferação celular, saúde intestinal e absorção dos nutrientes. Com a superdosagem de fitase e a redução nos níveis dos aminoácidos observa-se uma maior digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo que reduzindo 5% as concentrações de metionina, lisina e treonina houve um aumento na disponibilidade de Cálcio. Recomenda-se a redução nos níveis de Ca e P das dietas, valorizando a disponibilidade destes minerais pela matriz da enzima, e a suplementação de 1500 FTU/kg de fitase bacteriana. Esta superdosagem permitiu a redução de até 10% na suplementação dos aminoácidos metionina, lisina e treonina na dieta de frangos de corte.

Palavras-chave: Digestibilidade ileal, morfometria intestinal, fitato

Superdosing of bacterial phytase (EC 3.1.3.26) with reduction in digestible amino acids levels in diets for broilers

Abstract: The objective of this study was to evaluate the supplementation of phytase superdosing in diets with reduction of amino acid levels for broiler chickens from 1 to 45 days under performance parameters, carcass characteristics, intestinal morphometry and ileal digestibility. A total of 1848 male broilers of the COBB 500 strain, with an initial weight of $46 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$ divided in twelve treatments, were distributed in a completely randomized design in a 3x4 factorial scheme (three nutritional matrices with reduction of 0, 5 and 10% in levels of methionine, lysine and threonine digestible amino acids) and four levels of phytase (0, 500, 1500 and 3000 FTU / kg), seven replicates of twenty-two birds per experimental unit. For the ileal digestibility, a separate experiment was set up following the same experimental design, however 252 animals were distributed in 12 treatments, 3 replicates of 7 birds each. The analysis of variance of the data was performed and for the determination of the FTU levels, the regression analysis was used. For the nutritional matrices, the Tukey test was used, at 5% probability. And for the interactions between the nutritional matrices and the FTU levels the unfolding was performed. From the results obtained in this research, it is reported that, after phytase supplementation at 1500FTU / kg, it is possible to reduce by up to 10% the levels of the first three limiting amino acids for broilers from 1 to 45 days without affecting performance of the animals. Phytase superdosing promoted a greater availability of phosphorus and improvement in the digestive tract of birds, increasing the ratio vilo: crypt, as well as the villi area. These factors are related to cell proliferation, intestinal health and absorption of nutrients. With phytase superdosing and reduction in amino acid levels, a greater digestibility of essential and non-essential amino acids is observed, with a reduction of methionine, lysine and threonine concentrations by 5%. It is recommended to reduce the Ca and P levels of the diets, valuing the availability of these minerals by the enzyme matrix, and the supplementation of 1500 FTU / kg of bacterial phytase. This superdosing allowed the reduction of up to 10% in the supplementation of the amino acids methionine, lysine and threonine in the diet of broilers.

Keywords: ileal digestibility, intestinal morphology, phytate

Introdução:

O surgimento do conceito de proteína ideal na avicultura permite adequar na formulação de rações, os níveis de suplementação dos aminoácidos mais próximos dos exigidos pelas aves. Nesse contexto, houve grande desenvolvimento dos aminoácidos industriais para serem introduzidos à dieta. No entanto, este avanço no setor é limitado, tornando, muitas vezes, inviável a aquisição destes insumos.

Os ingredientes utilizados nas rações de aves, como o milho e a soja, são ricos em aminoácidos que podem suprir, em partes, as necessidades dos animais, reduzindo a utilização de fontes industriais destes nutrientes. Para tanto, os processos digestivos e metabólicos devem agir sinergicamente proporcionando o aproveitamento balanceado destes aminoácidos.

Como fator limitante à disponibilidade dos aminoácidos pode-se inferir sobre a molécula do fitato. Esta possui a capacidade de se ligar a diversos componentes das dietas e um deles são os aminoácidos presentes em ingredientes como o milho e a soja, deixando-os indisponíveis às aves.

Pode agir ainda inibindo as enzimas endógenas, como exemplo a tripsina e a pepsina (Liu et al., 2009), diminuindo a ação digestiva das mesmas, aumentando a exigência nutricional das aves para estes nutrientes.

A adição de fitase exógena em níveis elevados de FTU pode diminuir os efeitos antinutricionais presente no fitato, e possibilitar uma digestão mais eficiente dos aminoácidos (Morgan et al., 2016), preservando assim o epitélio intestinal, diminuindo o turnover celular, e consequentemente reduzindo a demanda metabólica das aves.

Nesse contexto a utilização da fitase em dietas para frangos de corte surge como uma alternativa viável à redução quanto a suplementação de aminoácidos industriais.

Diante da hipótese que utilizando a fitase exógena nas dietas é possível disponibilizar aminoácidos, restringindo assim o uso de fontes industriais destes ingrediente, sem afetar o desempenho dos animais, objetivou-se avaliar a suplementação de superdosagens de fitase na dieta, com redução nos níveis de aminoácidos, de frangos de corte entre 1 e 45 dias sobre a performance, as características de carcaça, a morfometria intestinal e a digestibilidade ileal.

Material e Métodos:

O experimento foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (Brasil), e aprovado com número de protocolo n°023/2017.

Desenho experimental, instalações e dietas

A pesquisa foi desenvolvida no Módulo de Avicultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, localizado no município de Areia – PB, Brasil.

Foram utilizados 1848 frangos machos da linhagem *COBB 500*, com peso inicial médio de $46g \pm 0,02g$, divididos em doze tratamentos, sete repetições, e vinte e duas aves por unidade experimental, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (três matrizes nutricionais, 100, 95 e 90% de aminoácidos e quatro níveis de fitase: 0, 500, 1500 e 3000 FTU/kg). A fitase exógena utilizada foi proveniente de bactérias *Escherichia coli* e classificadas como 6-fitase (EC 3.1.3.26).

As aves foram alojadas em galpão aberto coberto com telhas de amianto, sentido leste/oeste, contendo ventiladores e dividido em 74 boxes de $1,50\text{ m} \times 1,50\text{ m}$, com piso de cimento que foi coberto com bagaço de cana de açúcar para dispor a cama aviária.

As instalações eram equipadas com bebedouros pendulares e comedouros tubulares. A ração, assim como a água foram fornecidos à vontade.

O programa de luz adotado foi de 24 horas de luz (12 horas natural + 12 horas artificial) e até o 13º dia de vida, os pintinhos receberam aquecimento a partir da utilização de campânulas à lenha. Após esse período a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram mensuradas obtendo médias de $26,5^{\circ}\text{C}$ e 68,7%, respectivamente.

A criação das aves foi dividida em três fases quanto ao programa alimentar (inicial - 1 a 21 dias, crescimento - 22 a 35 dias e final - 36 a 45 dias). As rações fareladas a base de milho e farelo de soja foram formuladas de acordo com as recomendações nutricionais propostas por Rostagno et al. (2011) para cada fase de criação. A matriz 1 atendia todos os níveis nutricionais recomendados, na matriz 2 foi feita uma redução de 5% nos aminoácidos digestíveis (metionina, metionina + cistina e lisina em todas as fases; e na fase inicial 1 a 21 dias ainda foi reduzido a treonina). E na matriz 3 houve uma redução de 10% na suplementação destes aminoácidos. Apesar da redução nos níveis de aminoácidos digestíveis, as dietas foram formuladas de maneira que ficaram isoproteicas e isoenergéticas. A suplementação da enzima fitase foi realizada em substituição ao inerte nas proporções de zero, 0,100, 0,300 e 0,600 kg/ton, atendendo aos níveis de 0, 500, 1500 e 3000 FTU/kg, conforme apresentado na Tabela 01. Para as exigências de cálcio e fósforo, foi levado em consideração que a matriz da

enzima libera 500 FTU/kg, ou seja, 0,165% de cálcio e 0,150% de fósforo disponível.

Quanto a enzima xilanase, a utilização foi *over the top*, em todas as dietas.

Tabela 01 – Dietas experimentais para frangos de corte de 1 a 21, 22 a 35 e 36 a 45 dias de idade.

Ingredientes	1 a 21 dias			22 a 35 dias			36 a 45 dias		
	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3
Milho, 7,88%	589,080	585,820	582,790	615,109	612,772	610,519	658,370	656,271	654,170
Farelo de soja, 45,22%	356,900	361,400	365,800	321,200	324,288	327,355	282,167	285,034	287,901
Óleo de soja	19,500	20,670	21,700	36,516	37,358	38,193	35,226	36,008	36,790
Fosfato bicálcico	7,370	7,330	7,300	3,272	3,321	3,298	1,198	1,177	1,156
Calcário	11,430	11,430	11,400	11,022	11,019	11,016	10,110	10,107	10,104
Sal	4,930	4,930	4,930	4,566	4,565	4,565	4,437	4,437	4,437
DL-Metionina	3,390	2,880	2,370	2,833	2,376	1,929	2,626	2,198	1,773
L-Lisina HCl	4,220	2,850	1,500	3,272	2,091	0,915	3,656	2,558	1,459
L-Treonina	0,970	0,480	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Colina	0,700	0,700	0,700	0,700	0,700	0,700	0,700	0,700	0,700
Mineral px ¹	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Vitamínico px ²	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Antioxidante ³	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Xilanase ⁴	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
Fitase ⁵	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Inerte ⁶	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600
Total (kg)	1000,000	1000,000	1000,000	1000,000	1000,000	1000,000	1000,000	1000,000	1000,000
Composição química									
PB, %	21,800	21,800	21,800	19,800	19,800	19,800	18,400	18,400	18,400
EM, kcal/kg	3005,000	3005,000	3005,000	3150,000	3150,000	3150,000	3200,000	3200,000	3200,000
Met dig, %	0,618	0,570	0,521	0,547	0,503	0,461	0,511	0,471	0,431
Met + Cys dig, %	0,914	0,868	0,822	0,826	0,784	0,734	0,774	0,735	0,696
Lys dig, %	1,270	1,206	1,143	1,131	1,074	1,017	1,060	1,007	0,954
Thre dig, %	0,826	0,784	0,743	0,681	0,685	0,689	0,631	0,635	0,639
Val dig, %	0,908	0,916	0,924	0,846	0,852	0,857	0,784	0,789	0,794
Ile dig %	0,827	0,835	0,842	0,772	0,778	0,783	0,708	0,713	0,718
Leu dig %	1,669	1,681	1,692	1,578	1,586	1,594	1,493	1,500	1,508
Arg dig %	1,332	1,345	1,358	1,241	1,250	1,259	1,133	1,141	1,149
Phe dig %	0,979	0,987	0,996	0,909	0,915	0,921	0,839	0,845	0,850
Phe + Tyr dig %	1,673	1,688	1,703	1,555	1,565	1,575	1,435	1,444	1,454
Gly + Ser dig %	1,771	1,787	1,802	1,664	1,675	1,685	1,536	1,546	1,556
His dig %	0,524	0,528	0,532	0,489	0,492	0,495	0,454	0,457	0,460
Ca, %	0,715	0,715	0,715	0,593	0,593	0,593	0,498	0,498	0,498
Av. P., %	0,285	0,285	0,285	0,204	0,204	0,204	0,159	0,159	0,159
Na, %	0,215	0,215	0,215	0,200	0,200	0,200	0,195	0,195	0,195
Cl, %	0,347	0,347	0,347	0,335	0,335	0,335	0,318	0,318	0,318
K, %	0,820	0,831	0,838	0,766	0,771	0,776	0,710	0,710	0,716
Phytic P, % *	0,233	0,234	0,235	0,226	0,226	0,227	0,221	0,221	0,222
EB, mEq/kg	206,000	202,000	210,000	188,000	189,000	190,000	176,000	177,000	178,000
Atividade Enzimática									
Fitase									
0 FTU	<50	<50	~85	<50	<50	<50	<50	<50	<50
500 FTU	233	593	603	775	1170	668	667	466	948
1500 FTU	2200	1730	2110	1980	1590	1950	1990	1550	2040
3000 FTU	3500	2440	3840	3020	3620	3720	3840	3520	3960
Composição Analisada									
CP, %	22,975	21,95	22,55						
Met, %	0,657	0,572	0,525						
Cys, %	0,360	0,350	0,372						
Lys, %	1,357	1,252	1,155						
Thr, %	0,905	0,857	0,827						
Val, %	0,932	0,915	0,962						
Iso, %	0,847	0,840	0,880						
Ca, %	0,805	0,827	0,812						
P, %	0,485	0,507	0,502						

¹Pré-mistura mínima por quilograma de alimento: Mn: 60 g; Fe: 80 g; Zn: 50 g; Cu: 10 g; Co: 2 g; I: 1 g, selênio: 250 mg.

²Pré-mistura de vitaminas por quilograma de ração: vitamina A: 15 000 000 UI; vitamina D3: 1.500.000 UI; vitamina E: 15 000 UI; vitamina B1: 2,0 g; vitamina B2: 4,0 g; vitamina B6: 3,0 g; vitamina B12: 0,015 g; ácido nicotínico: 25 g; ácido pantotênico: 10 g; vitamina K3: 3,0 g; ácido fólico: 1,0 g.

³Etoxiqum

⁴Econase XT – 9600BXU/kg

⁵Quantum Blue 5000; Contribuição da enzima suplementando 500 FTU: Fósforo disponível 0,150%, Cálcio 0,165%, Sódio 0,035%, Lisina 0,017%, Metionina 0,004%, Cistina 0,035%, Treonina 0,033%, Proteína Bruta 0,421%, Energia Metabolizável 52kcal/kg

⁶Areia lavada

Atividade Enzimática

A fitase recuperada nas dietas foi analisada pelo Enzyme Services and Consultancy (Blackwood, País de Gales), de acordo com os métodos modificados apresentados por Engelen et al. (2001).

Variáveis Analisadas:

Desempenho

As variáveis para avaliação do desempenho zootécnico, durante as três fases de criação, foram o consumo de ração (CR, kg/ave), o ganho de peso (GP, kg/ave) e a conversão alimentar (CA, kg/kg). As mensurações para tal avaliação foram determinadas ao final de cada fase (1 a 21; 1 a 35 e 1 a 45 dias).

O consumo de ração foi obtido pela diferença entre o fornecido e as sobras, ao final de cada fase de criação. O ganho de peso foi obtido com as pesagens dos animais no início e final de cada fase, aplicando a diferença entre o peso final e o inicial. A conversão alimentar foi obtida através da relação estabelecida entre o consumo de ração o ganho de peso, em cada fase e as mortalidades foram anotadas e utilizadas para as correções nos dados de desempenho.

Características de Carcaça

Aos 45 dias de idade, três aves por parcela foram selecionadas de acordo com o peso médio e após jejum alimentar de 6 horas foram eutanasiadas e abatidas para a análise das características da carcaça, totalizando 21 aves por tratamento.

Avaliou-se o peso vivo dos animais em jejum (PVJ, kg/ave), utilizando uma balança com variação de 1 grama. O rendimento da carcaça (RCA, %) foi determinado pela relação entre o peso vivo em jejum com o peso da carcaça depenada, eviscerada e retirada a cabeça. Os rendimentos dos cortes nobres foram determinados pela relação do peso do corte com o peso da carcaça, expresso em porcentagem, tais como o rendimento de peito (RP, %), o rendimento de coxa (RC, %), e o rendimento de sobrecoxa (RSCO, %). Também foi coletado e determinado o peso da gordura visceral (PGV, g).

Morfometria intestinal

No 21º e no 45º dias de experimento, uma ave por repetição foi escolhida, a partir do peso médio da parcela, e eutanasiada para posterior coleta.

Procedeu-se à coleta de um fragmento de 1 cm da porção média do duodeno de cada ave, perfazendo 7 fragmentos por tratamento, o qual foi fixado por imersão em formol a 10%.

Os fragmentos do tecido foram incluídos em parafina, segundo processamento histológico padrão descrito por Ramos et al. (2011). Em seguida, foi realizada a microtomia, com 5 micrômetros de espessura em cada bloco (fragmento de intestino) de parafina, resultando em 3 lâminas histológicas para cada animal, a qual foi submetida à coloração por “[Periodic Acid Schiff](#)” (PAS) e digitalizada em câmera Motic acoplada em microscópio Olympus BX-53, com o programa que analisa as imagens Motic Image Plus 2.0.

Para cada fotomicrografia foram realizadas três mensurações quanto à altura da vilosidade intestinal e sua respectiva cripta, perfazendo um número amostral de 63 mensurações (7 animais x 3 fotomicrografias x 3 mensurações) para cada variável supracitada, em cada tratamento. A altura de vilo (AV, μm) foi tomada a partir da região da mucosa intestinal que coincidia com a porção superior das criptas, até seu ápice. A profundidade de cripta (PC, μm) foi medida considerando a distância entre a sua base até a região de transição entre a cripta e a vilosidade. A largura de vilo (LV, μm) foi medida na porção medial do vilo. A relação vilo:cripta (V/C) foi determinada através da relação entre a altura do vilo e a profundidade da cripta. A área de vilo (ARV, μm^2) foi determinada pela multiplicação entre a altura e a largura de vilo. As análises histomorfométricas foram realizadas por um único histologista a fim de evitar erros quanto a interpretação.

Digestibilidade Ileal

Foi realizado um experimento em paralelo, quando as aves atingiram 14 dias de idade, para avaliação da digestibilidade das dietas. Um total de 252 animais foram pesados e distribuídos em doze tratamentos, 3 repetições de 7 aves por unidade experimental, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (três matrizes nutricionais e quatro níveis de fitase: 0, 500, 1500 e 3000 FTU/kg). Foi realizado um período de adaptação de 7 dias dos animais à ração adicionada de 1% do marcador (óxido de cromo – Cr_2O_3). Em seguida foi realizada a coleta do conteúdo ileal de 5 frangos de corte por parcela, com 21 dias de idade, a partir da eutanásia das aves, e posterior coleta.

Foi separado o íleo do trato gastrointestinal nas seguintes proporções: 2 cm após o divertículo de Meckel e 4 cm próximos a junção íleo-cecal. Realizou-se também a abertura de todo íleo, expondo a digesta, e coletado cuidadosamente todo o conteúdo ileal, que foi armazenado em placas de petri.

As amostras foram agrupadas por parcela, devidamente identificadas e mantidas em gelo antes de serem congeladas a -20°C para posterior liofilização e armazenamento. As amostras foram finamente trituradas para passarem por uma tela de 1mm.

As concentrações de aminoácidos na dieta e na digesta ileal foram determinadas por HPLC, de acordo com os métodos descritos pelo AOAC (2006) para a hidrólise padrão de proteínas (método 45.3.05).

As dietas e a digesta ileal foram submetidas a uma análise total de Ca e P, utilizando uma digestão com ácido nítrico e perclórico. O fósforo nas dietas e na digesta foram analisadas colorimetricamente a partir de um espectrofotômetro Genesys 5 (*Thermo Electron Corp., Madison, WI*) a 410 nm, de acordo com os métodos estabelecidos pelo AOAC (1970) para P (método 7.095-7.098).

O cálcio presente na dieta e na digesta foi estabelecido a partir da análise por espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer® (*Analyst 800, Ueberlingen, Alemanha*) e 1% de óxido de lantânio, de acordo com os métodos estabelecidos pelo analista 800, Atomic Absorption Spectrophotometer (Perkin Elmer Instruments, 1998). As concentrações de Cr₂O₃ da dieta e da digesta ileal foram analisados usando o procedimento descrito por Williams et al. (1962).

Cálculos da digestibilidade

O indicador Cr₂O₃, os valores dos aminoácidos, Ca e P das dietas e das digestas foram calculados a partir da digestibilidade aparente dos aminoácidos, e disponibilidade de Ca e P. Para tanto utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Digestibilidade} = ((\text{nutriente da dieta} / \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ da dieta}) / (\text{nutriente ileal} / \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ ileal})) / (\text{nutriente da dieta} / \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ da dieta}) \times 100$$

Análises Estatísticas

Foi utilizado o software SAS (SAS Institute, 2011) para obtenção das análises estatísticas, onde foram realizadas as análises de variância dos dados. Para análise das médias obtidas a partir da análise do fator estudado (matriz nutricional) foi realizada a comparação das médias obtidas e aplicado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quando houve interação dos fatores, matrizes nutricionais e níveis de FTU, foram realizados os desdobramentos, e as médias isoladas das matrizes nutricionais foram comparadas pelo teste Tukey, à 5% de probabilidade, para cada nível de suplementação de FTU.

Para estabelecer o melhor nível de utilização da fitase exógena, foi aplicado o modelo de regressão, dentro de cada matriz nutricional. Para esta análise apenas as variáveis de maior relevância zootécnica foram demonstradas nas tabelas de resultados.

Na variável de digestibilidade realizou-se a elaboração de figuras para melhor visualização das interações.

Resultados:

No presente estudo, a taxa de mortalidade de frangos de corte estava no intervalo esperado e não foi influenciada pelas dietas testadas (dados não apresentados).

Análise das dietas

Todas as dietas foram avaliadas para determinar a atividade enzimática da fitase exógena, e verificou-se que houve variação dos níveis encontrados quanto às análises entre as matrizes. No entanto, o conceito de superdosagem foi mantido em cada tratamento e em cada fase. Os níveis dos aminoácidos que sofreram redução (metionina, lisina e treonina) foram considerados de acordo com a ideia do trabalho. Os níveis de Ca, P e proteína bruta ficaram dentro do esperado.

Desempenho

De acordo com os dados apresentados na Tabela 02, de 1 a 21 dias observa-se que houve efeito significativo no consumo de ração (CR/kg) ($P < 0,001$) e na conversão alimentar (CA/kg/kg) ($P = 0,001$), nas diferentes matrizes nutricionais.

Houve interação entre matriz e FTU nas variáveis consumo de ração e conversão alimentar ($P = 0,005$), descritos na Tabela 03. Observando os desdobramentos das interações verifica-se que os níveis de FTU, dentro da matriz 2, proporcionaram um maior consumo de ração quando suplementado com 1667 FTU/kg. Já quanto a conversão alimentar houve uma redução, de maneira linear quando houve a suplementação da fitase em níveis crescentes à matriz 3.

Os diferentes níveis de FTU influenciaram significativamente ($P < 0,001$) todas as variáveis de desempenho desta fase, sendo que para um maior ganho de peso, o nível de suplementação da fitase foi estimado em 2250 FTU/kg.

No período de 1 a 35 dias de idade observou-se um efeito isolado entre as matrizes nutricionais ($P = 0,002$) quanto ao consumo de ração. Os animais que receberam tal dieta consumiram menos, em comparação aos animais alimentados com dietas contendo redução de 5% (matriz 2) e 10% de aminoácidos (matriz 3).

Os níveis de suplementação da fitase influenciaram significativamente as variáveis consumo de ração e ganho de peso ($P<0,001$), estimando-se que 2000 FTU/kg favorece o maior consumo de ração e o maior ganho de peso (Tabela 02).

Foi observado interação entre os níveis de fitase e as matrizes nutricionais na variável conversão alimentar ($P=0,021$) na fase de 1 a 35 dias. Após o desdobramento desta interação observa-se que a suplementação de fitase na matriz 1 possibilitou uma redução na CA promovendo uma menor conversão quando a suplementação foi de 1500 FTU/kg. Já na matriz 3, a menor conversão alimentar foi estimada quando suplementado 3500 FTU/kg. Como não houve um nível exato desta suplementação é correto estimar que um nível de 3000 FTU/kg na matriz 3 poderia reduzir significativamente a conversão alimentar (Tabela 03).

Tabela 02 - Desempenho de frangos de corte alimentados com níveis crescentes de FTU em diferentes matrizes nutricionais

FTU	1 a 21 dias			1 a 35 dias			1 a 45 dias		
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)
0	1,491	1,042	1,43	3,783	2,386	1,59	5,916	3,354	1,76
500	1,513	1,089	1,39	3,891	2,524	1,55	5,977	3,493	1,71
1500	1,556	1,133	1,37	3,964	2,582	1,54	6,073	3,594	1,69
3000	1,560	1,146	1,36	3,931	2,566	1,53	6,023	3,561	1,69
Regressão									
L	0,001	<0,001	0,035	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
Q	0,905	0,029	0,373	0,029	0,010	0,005	0,005	0,013	0,007
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
Matriz*									
1	1,503b	1,099	1,36b	3,838b	2,491	1,542 b	5,99	3,492	1,72
2	1,550a	1,107	1,40a	3,918a	2,527	1,550 ab	6,002	3,497	1,72
3	1,540a	1,102	1,39a	3,913a	2,512	1,560 a	5,992	3,497	1,71
P	<0,001	0,476	0,001	0,002	0,205	0,019	0,922	0,950	0,945
FTU x Matriz									
P	0,005	0,922	0,005	0,304	0,146	0,021	0,396	0,203	0,650
SEM	0,041	0,013	0,034	0,025	0,023	0,039	0,02	0,017	0,028
C.V.(%)	2,3	2,8	2,4	1,76	2,07	1,13	1,97	1,57	1,08

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$); (GP_{1 a 21 dias}; $y = -0,00000002x^2 + 0,00009x + 1,0448$; R^2 0,99; Max: 2250 FTU); (CR_{1 a 35 dias}; $y = -0,00000005x^2 + 0,0002x + 3,7916$; R^2 0,98; Max: 2000 FTU); (GP_{1 a 35 dias}; $y = -0,00000005x^2 + 0,0002x + 2,4029$; R^2 0,93; Max: 2000); (CR_{1 a 45 dias}; $y = -0,00000004x^2 + 0,0002x + 5,9114$; R^2 0,99; Max: 2500); (GP_{1 a 45 dias}; $y = -0,00000006x^2 + 0,0003x + 3,3639$; R^2 0,98; Max: 2500); (CA_{1 a 45 dias}; $y = 0,00000002x^2 - 0,00008x + 1,7576$; R^2 0,93; Min: 2000).

Analisando as fases acumuladas de 1 a 45 dias observa-se que não houve efeito entre matrizes nutricionais assim como não houve interação entre a matriz e o nível de

suplementação de fitase avaliados, para todas as variáveis de desempenho. No entanto, observa-se efeito isolado da suplementação dos níveis de FTU, estimando-se assim que para um maior consumo de ração e um maior ganho de peso a enzima deve ser suplementada em 2500FTU/kg, já para a variável conversão alimentar um nível de suplementação de 2000 FTU/kg proporcionou menor conversão para as aves entre 1 e 45 dias de idade (Tabela 02).

Tabela 03 - Desdobramento das interações de diferentes níveis de FTU associado a diferentes matrizes nutricionais nas variáveis de consumo de ração e conversão alimentar em frangos de 1 a 21 dias e na conversão alimentar de frangos de 1 a 35 dias

CR (kg) 1 a 21 dias				CA (kg/kg) 1 a 21 dias			CA (kg/kg) 1 a 35 dias		
Matriz*				Matriz*			Matriz*		
FTU	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	1,440b	1,500a	1,526a	1,38b	1,42b	1,47a	1,57b	1,57b	1,62 ^a
500	1,476b	1,562a	1,524ab	1,36b	1,42a	1,39ab	1,54	1,54	1,57
1500	1,522b	1,591a	1,561ab	1,35	1,40	1,37	1,52	1,54	1,55
3000	1,567	1,566	1,546	1,36	1,37	1,35	1,53	1,54	1,53
Regressão									
L	0,283	0,001	0,203	0,206	0,829	0,006	0,003	0,167	0,002
Q	0,804	0,003	0,311	0,579	0,658	0,110	0,050	0,338	0,001

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha e na mesma variável diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$); (CR Matriz 2, 1 a 21 dias; $y = -0,00000003x^2 + 0,0001x + 1,5067$; R^2 0,95; Max: 1667 FTU); (CA Matriz 3, 1 a 21 dias; $y = -0,00002 + 1,4001$; R^2 0,99); (CA Matriz 1, 1 a 35 dias; $y = 0,00000002x^2 - 0,00006x + 1,5715$; R^2 0,97; Min 1500 FTU); (CA Matriz 3, 1 a 35 dias; $y = 0,00000001x^2 - 0,00007x + 1,6143$; R^2 0,98; Min: 3500 FTU).

Características de Carcaça

Não houve efeito isolado entre as matrizes nutricionais para as características de carcaça analisadas nesse estudo (Tabela 04).

Houve efeito dos níveis de suplementação da fitase para rendimento de carcaça, estimando-se que o nível de suplementação de 827 FTU/kg seria ideal para os menores RCA.

Nas variáveis de RSCO ($P = 0,027$) e RP ($P = 0,032$), os níveis de FTU influenciaram significativamente, estimando-se que uma suplementação de 1500 e 1000 FTU/kg, proporcionaria os maiores RSCO e RP, respectivamente.

Tabela 04 - Características de carcaça de frangos de corte com 45 dias alimentados com níveis crescentes de FTU em diferentes matrizes nutricionais

FTU	PVJ (kg/ave)	RCA (%)	RC (%)	RSCO (%)	RP (%)	PGV (g)
0	3,347	81,080	11,950	14,980	37,040	0,035
500	3,431	81,460	11,840	15,220	36,820	0,039
1500	3,513	81,760	11,910	15,420	36,870	0,036
3000	3,539	81,740	11,740	15,010	37,680	0,032
FTU/kg						
L	0,001	0,004	0,668	0,003	0,068	0,009
Q	0,564	0,008	0,261	0,005	0,047	0,023
P	<0,001	0,011	0,274	0,027	0,032	<0,001
Matriz						
1	3,453	81,330	11,740	15,000	37,390	0,0370
2	3,455	81,780	11,890	15,260	37,270	0,0360
3	3,464	81,400	11,930	15,170	36,720	0,0335
P	0,785	0,085	0,146	0,262	0,065	0,058
FTU x Matriz						
P	0,032	0,251	0,900	0,319	0,366	0,012
SEM	0,032	0,014	0,053	0,079	0,038	0,400
C.V.(%)	3,57	1,47	5,07	5,53	4,68	27,03

(RCA, $y = -0,0000002x^2 + 0,0007x + 81,11$; R^2 0,82; Min 827 FTU); (RSCO, $y = -0,0000002x^2 + 0,0006x + 14,984$, R^2 0,99; Max: 1500 FTU); (RP, $y = 0,0000002x^2 + 0,0004x + 37,02$; R^2 0,98; Min: 1000 FTU); (PGV, $y = 0,00000004x^2 - 0,000008x + 0,0388$; R^2 0,82; Min 1000 FTU).

Observa-se que houve interação significativa entre os níveis de fitase e as matrizes nutricionais analisadas nesta pesquisa para a variável peso vivo em jejum ($P=0,032$) dos animais destinados ao abate (Tabela 04).

O desdobramento desta interação está descrito na Tabela 05 e mostra que na matriz 1 estima-se que um nível de suplementação de 3333 FTU/kg proporcionaria animais mais pesados ao abate. Como não houve este nível de suplementação, é correto afirmar que 3000 FTU/kg na matriz 2 seria o melhor nível de suplementação da fitase.

Para a matriz 3, o efeito dos níveis de suplementação da fitase teve um comportamento linear, ou seja, os maiores níveis de FTU proporcionaram aves mais pesadas ao abate. Juntamente com esses resultados, verifica-se que as aves alimentadas com 3000 FTU na matriz 1 e na matriz 3 não diferiram significativamente entre si na variável analisada (PVJ), demonstrando que mesmo com a redução nos níveis de aminoácidos a suplementação da fitase seria capaz de disponibilizar os nutrientes (aminoácidos) possibilitando resultados satisfatórios.

Tabela 05 - Efeito da interação de diferentes níveis de FTU associado a diferentes matrizes nutricionais sobre o peso vivo de frangos de corte de 45 dias de idade

FTU	Matriz		
	1	2	3
0	3,297	3,368	3,376
500	3,406	3,439	3,444
1500	3,512	3,532	3,493
3000	3,589 a	3,480 b	3,547 ab
Regressão			
Linear	0,032	0,001	0,005
Quadrática	0,045	0,034	0,543

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey 5% ($P < 0,05$); (PVJ_{matriz 1}: $y = -0,00000003x^2 + 0,0002x + 3,3048$; R^2 0,99; Max: 3333 FTU/kg); (PVJ_{matriz 2}: $y = -0,00000005x^2 + 0,0002x + 3,3656$; R^2 0,99; Max: 2000 FTU/kg); (PVJ_{matriz 3}: $y = 0,00005x + 3,3986$; R^2 0,92).

Morfometria intestinal

Na tabela 06 está expresso os resultados da morfometria do aparelho digestivo (duodeno) dos frangos de corte com 21 e com 45 dias de idade. Observa-se que em todas as variáveis analisadas houve interação entre os níveis de fitase e as matrizes nutricionais ($P < 0,005$).

A relação vilo:cripta pode ser considerada um parâmetro para analisar a morfometria do intestino das aves como resposta a renovação celular e a concentração de células absortivas de nutrientes.

A interação entre estas variáveis é demonstrada na Tabela 07, onde verifica-se que os níveis de fitase tiveram influência dentro das matrizes nutricionais, sendo aos 21 dias a menor relação vilo:cripta, e que foi estimada a partir de uma suplementação entre 1357 e 1000 FTU/kg na matriz 2 e 3, respectivamente. Nestas duas matrizes em que houve redução, a suplementação de 3000 FTU/kg apresentou a maior relação vilo:cripta sendo de 8,72 na matriz 2 e 8,20 na matriz 3.

Observando o desdobramento da interação entre os níveis de fitase e as matrizes nutricionais para a variável vilo:cripta aos 45 dias, verifica-se que na matriz 1 a maior relação é estimada ao suplementar um nível de 1833 FTU/kg. Já na matriz 2 estima-se que suplementando 1333 FTU/kg encontraria uma menor relação desta variável.

Tabela 06 - Morfometria do duodeno de frangos de corte com 21 e 45 dias

FTU	21 dias					45 dias				
	AV (μm)	LV (μm)	PC (μm)	V:C	AKV (μm^2)	AV (μm)	LV (μm)	PC (μm)	V:C	AKV (μm^2)
0	1020,1	108,1	140,8	7,3	110207,2	1147,1	133,0	218,5	5,6	154354,0
500	952,3	105,0	141,5	6,7	99961,2	1049,8	122,7	199,8	5,6	130089,0
1500	1044,6	110,3	149,0	7,0	115225,7	1094,6	135,6	200,0	6,1	147399,0
3000	960,1	111,6	121,0	7,9	107125,8	1135,9	142,3	204,3	6,1	163987,0
Regressão										
L	0,067	0,930	0,001	0,070	0,428	0,002	0,295	0,064	0,381	0,004
Q	<0,001	0,372	0,082	0,269	0,013	0,001	0,012	0,189	0,183	0,001
P	<0,001	0,563	<0,001	0,001	0,075	<0,001	0,001	0,093	0,113	<0,001
Matriz*										
1	951,84 b	104,35	138,462	6,87 b	99324,5 b	1096,14 ab	131,47 b	212,82	5,73	145636 b
2	1018,42 a	111,626	140,657	7,24 ab	113682,1 a	1143,07 a	141,28 a	199,31	6,09	163396 a
3	1012,56 a	110,264	135,014	7,50 a	111648,9 ab	1081,27 b	127,35 b	204,9	5,71	137803 b
P	0,002	0,198	0,232	0,044	0,013	0,007	0,003	0,182	0,054	<0,001
FTU x Matriz										
P	<0,001	0,033	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
SEM										
C.V.(%)	23,19	44,65	27,3	35,36	50,88	20,72	34,72	40,37	34,14	42,31

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

Observando a inclusão de níveis da enzima fitase em interação com as matrizes nutricionais pré-estabelecidas (Tabela 07) verifica-se que a suplementação enzimática em 3000 FTU/kg na matriz 2 obteve a maior área da vilosidade, verificando ainda que na matriz 3 associado ao nível de 1500 FTU/kg foi observado uma maior área de vilo, nos frangos de corte com 45 dias.

Tabela 07 – Desdobramento da interação de diferentes níveis de FTU associado a diferentes matrizes nutricionais sobre a relação entre a altura de vilo e a profundidade de cripta (V:C) do duodeno de frangos de corte com 21 e 45 dias de idade

FTU	V:C 21 dias			V:C 45 dias			ARV 45 dias		
	Matriz			Matriz			Matriz		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	7,13	7,38	7,23	4,80 b	6,65 a	5,47 b	144883 a	143278 b	144903 ab
500	5,74 b	7,17 a	7,50 a	5,32 b	5,21 b	6,21 a	139108 a	148997 a	102162 b
1500	7,89 a	6,26 b	7,13 ab	6,80 a	6,13 a	5,28 b	132575 b	144890 ab	165007 a
3000	6,95 b	8,72 a	8,20 a	6,03	6,38	5,88	135979 b	216417 a	139566 b
Regressão									
Linear	0,049	0,001	0,218	<0,001	0,034	0,476	0,005	0,001	0,219
Quadrática	<0,001	0,236	0,115	0,158	0,001	0,005	0,099	0,198	<0,001

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha e na mesma variável diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05); (V:C Matriz 2 – 21 dias: $y = 0,0000007x^2 - 0,0019x + 7,5713$; R^2 0,93; Min: 1357FTU/kg); (V:C Matriz 3 – 21 dias: $y = 0,0000002x^2 - 0,0004x + 7,3777$; R^2 0,83; Min: 1000 FTU/kg); (V:C Matriz 1 – 45 dias: $y = -0,0000006x^2 + 0,0022x + 4,6451$; R^2 0,94; Max: 1833 FTU/kg); (V:C Matriz 2 – 45 dias: $y = 0,0000003x^2 - 0,0008x + 6,2473$; R^2 0,27; Min: 1333 FTU/kg); (ARV Matriz 2 – 45 dias: $y = 23,639x + 133846$; R^2 0,78).

Digestibilidade Ileal

Na Tabela 08 estão descritos a digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais, metionina (Met), cistina (Cys), lisina (Lys), treonina (Thr), valina (Val), arginina (Arg), isoleucina (Iso), leucina (Leu), tirosina (Tyr), serina (Ser), prolina (Pro), fenilalanina (Phe), alanina (Ala), asparagina (Asp), glicina (Gly), histidina (His) e glutamina (Glu) a matéria seca (DM), proteína bruta (CP), a média da digestibilidade dos aminoácidos essenciais (AAE) e não essenciais (AANE), além da biodisponibilidade dos minerais fósforo (P) e cálcio (Ca).

Observa-se que houve interação entre as matrizes nutricionais e os níveis de fitase utilizados para todos os nutrientes analisados, indicando uma correlação direta entre os fatores durante a digestão.

Nas figuras 1 e 2 observa-se a análise da digestibilidade dos nutrientes sobre o efeito das matrizes nutricionais e dos níveis de FTU respectivamente.

Analisando a digestibilidade dos aminoácidos nas matrizes nutricionais verificou-se que a Met, Lys, Thr, Val, Iso, Leu, Tyr, Pro, Ala tiveram uma menor digestibilidade quando utilizou-se a redução de 10% dos aminoácidos das dietas (Tabela 08).

Efeito semelhante foi observado quando avaliou-se a digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais das matrizes nutricionais (Figura 3). Já para a avaliação isolada da digestibilidade dos aminoácidos associado aos níveis de FTU observou-se que apenas os aminoácidos Met, Lis, Pro, Asp, Glu foram significativamente diferentes entre os níveis de fitase (Tabela 08).

Avaliando a digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais sobre a influência da inclusão de diferentes níveis de fitase houve, percentualmente, uma maior digestibilidade destes aminoácidos a medida que se elevou o nível de FTU, sendo que ao nível de 1500 FTU/kg ocorreu esta maior digestibilidade (Figura 4).

Para a disponibilidade dos minerais cálcio e fósforo observou-se que não houve diferença significativa entre as matrizes nutricionais. Quanto ao efeito isolado da suplementação de fitase observou-se que à medida que se aumenta o nível de inclusão de fitase na dieta (0 para 3000 FTU/kg), a disponibilidade do P passa de 52,43% para 80,26%. Para o cálcio verificou-se um decréscimo na disponibilidade após a adição da fitase, sendo recuperado quando suplementou-se 3000 FTU/kg (Tabela 08).

Para a interação entre as matrizes nutricionais e os níveis de fitase foi possível observar na figura 5 o comportamento da digestibilidade dos nutrientes, dentro de cada matriz, com os níveis de suplementação de FTU avaliados.

No geral, observou-se que os níveis de cada aminoácido não sofreram influência significativa, variando muito pouco entre as matrizes. Para os minerais pode-se inferir que, em todas as matrizes a disponibilidade do fósforo foi maior quando houve um aumento nos níveis de inclusão de fitase, diferente do cálcio, que na matriz 1 e matriz 3 não apresentou uma disponibilidade significativamente melhor.

Destaca-se portanto que, na matriz 2, onde houve a redução em 5% nos níveis dos aminoácidos metionina, lisina e treonina, os minerais P e Ca, foram mais disponíveis quando houve o aumento da FTU, apresentando um comportamento linear, ou seja, quanto maior o nível de suplementação da fitase, maior foi a disponibilidade do Ca e do P.

Para a digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais, em cada matriz nutricional, onde variou os níveis de FTU, observou-se que uma redução nos níveis dos aminoácidos com a suplementação de uma superdosagem de fitase pode haver uma maior digestibilidade, tanto para os AAE como para os AANE (Figuras 6 e 7).

Tabela 08 – Digestibilidade dos nutrientes em diferentes matrizes nutricionais com diferentes níveis de FTU

FTU	Nutrientes (%)																						
	Met	Cys	Lys	Thr	Val	Arg	Iso	Leu	Tyr	Ser	Pro	Phe	Ala	Asp	Gly	His	Glu	DM	CP	AAE	AANE	P	Ca
0	92,84	67,60	85,70	76,52	80,30	87,31	81,65	83,50	79,11	80,53	80,99	84,54	82,04	79,18	76,25	84,41	85,88	68,71	81,23	84,05	81,47	52,43	54,60
500	91,54	67,74	84,26	75,38	79,01	86,81	81,15	83,02	78,52	80,28	79,97	83,45	80,99	78,95	74,77	83,35	85,63	66,76	79,19	82,82	80,84	63,57	48,23
1500	91,51	70,90	85,67	76,68	80,73	88,53	83,16	84,78	78,48	82,21	81,94	84,02	82,33	81,06	76,87	84,74	87,20	67,14	81,48	84,47	82,71	76,75	51,14
3000	90,75	68,65	83,79	75,08	78,94	86,69	81,10	83,36	79,84	81,26	82,52	83,75	80,78	79,73	74,32	83,06	86,02	67,71	80,05	83,40	82,10	80,26	53,19
Regressão																							
L	0,213	0,100	0,639	0,744	0,511	0,083	0,082	0,165	0,128	0,214	0,744	0,433	0,573	0,117	0,316	0,425	0,098	0,090	0,767	0,515	0,290	<0,0001	0,006
Q	0,023	0,289	0,011	0,088	0,041	0,046	0,044	0,048	0,662	0,133	0,025	0,157	0,058	0,115	0,043	0,041	0,068	0,244	0,002	0,040	0,084	0,691	0,018
P	0,009	0,113	0,051	0,362	0,189	0,069	0,059	0,073	0,221	0,061	0,004	0,456	0,248	0,041	0,136	0,155	0,038	0,237	0,019	0,190	0,101	<0,0001	0,003
Matriz*																							
1	93,51a	70,23	86,69a	78,65a	81,02*	87,79	82,72a	84,46a	80,46a	81,82	83,09*	83,65	82,76a	80,35	76,79	84,58	86,68	68,70	82,11	84,77a	82,58 a	68,72	50,21
2	91,44b	67,59	84,86b	75,40b	79,56ab	87,70	81,93ab	83,63ab	79,05ab	80,76	80,13b	84,62	81,49ab	79,62	75,21	83,91	86,24	66,71	80,10	83,91ab	81,81 ab	68,50	53,56
3	89,94c	68,29	82,99c	73,54b	78,67b	86,59	80,69b	82,91b	77,24b	80,61	80,67b	83,66	80,51b	79,25	74,75	83,26	85,64	67,25	79,26	82,37b	80,94 b	66,51	51,82
P	<0,001	0,217	<0,001	<0,001	0,016	0,065	0,013	0,034	0,002	0,191	0,001	0,140	0,013	0,251	0,082	0,108	0,078	0,157	0,001	0,004	0,050	0,128	0,120
FTU x Matriz																							
P	0,004	0,001	0,028	0,010	0,005	0,064	0,004	0,002	0,007	0,004	0,003	0,004	0,005	0,001	0,001	0,002	0,001	<0,001	0,003	0,012	0,001	0,186	<0,001
SEM	1,61	4,06	2,13	2,89	2,49	1,90	2,19	1,94	2,68	2,18	1,99	2,15	2,22	2,16	2,77	2,00	1,56	2,75	2,16	2,06	2,00	4,38	5,13
C.V.(%)	1,75	5,91	2,50	3,80	3,12	2,18	2,68	2,32	3,39	2,69	2,45	2,56	2,72	2,71	3,67	2,30	1,81	4,07	2,68	2,47	2,44	6,46	9,90

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05)

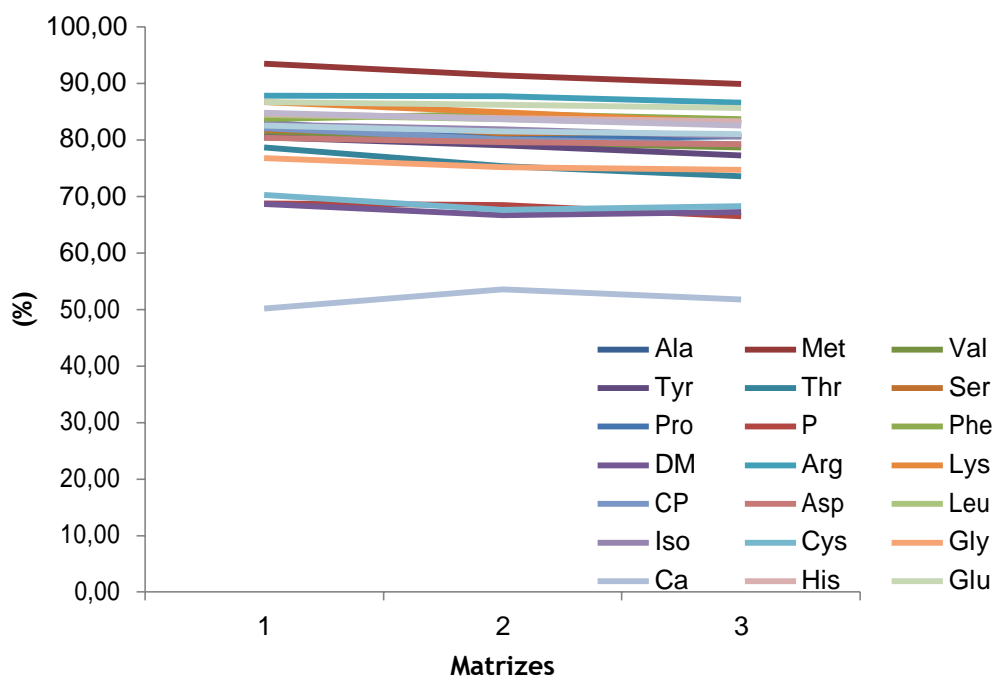


Figura 1 - Digestibilidade dos nutrientes em diferentes matrizes nutricionais

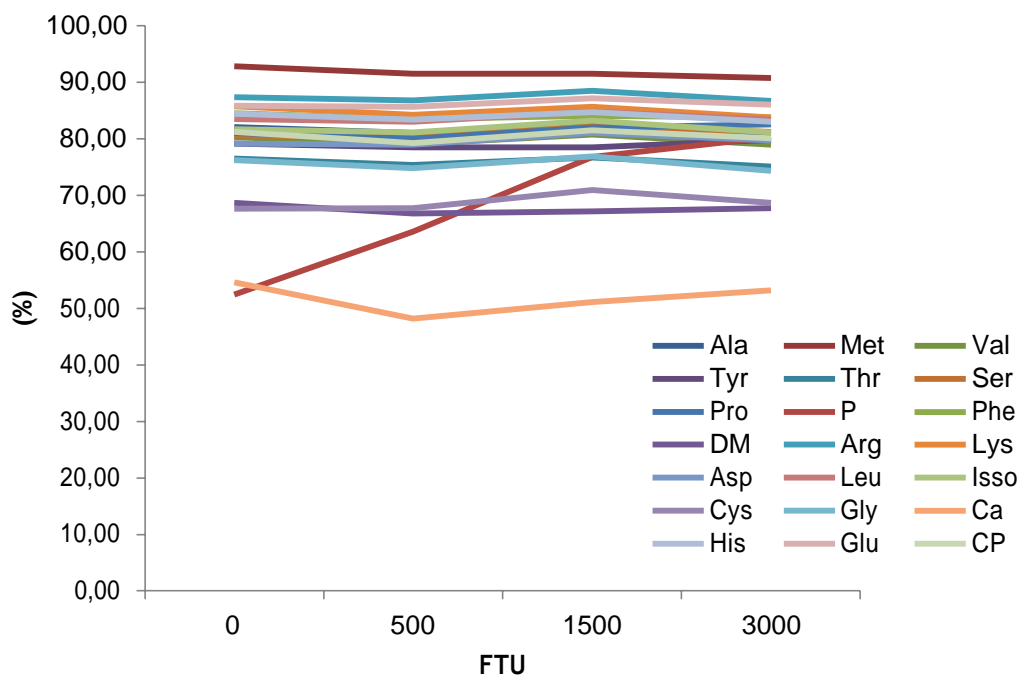


Figura 2 - Digestibilidade dos nutrientes em diferentes níveis de suplementação de FTU

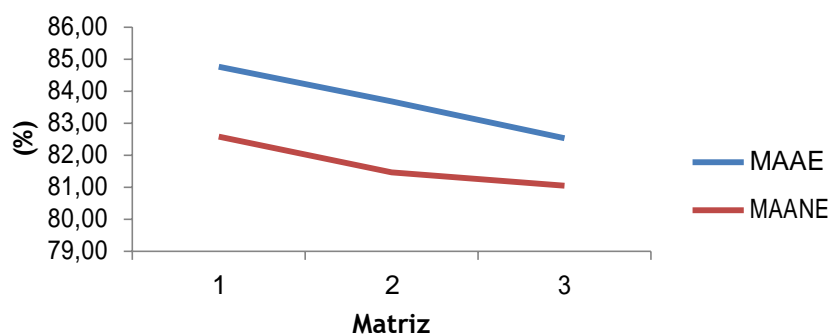


Figura 3 - Média da digestibilidade ileal dos aminoácidos essenciais (MAAE) e não essenciais (MAANE) em diferentes matrizes nutricionais

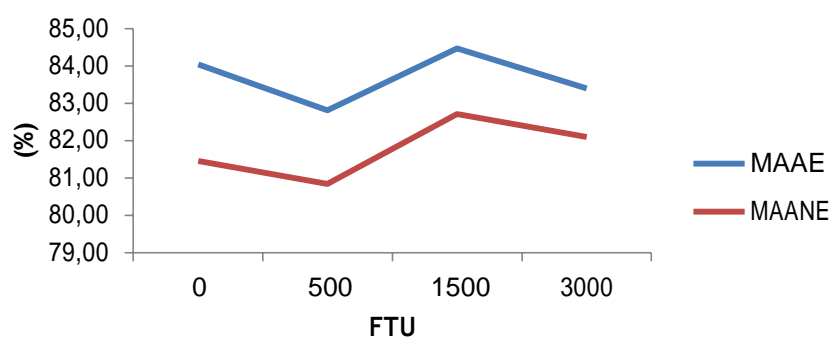
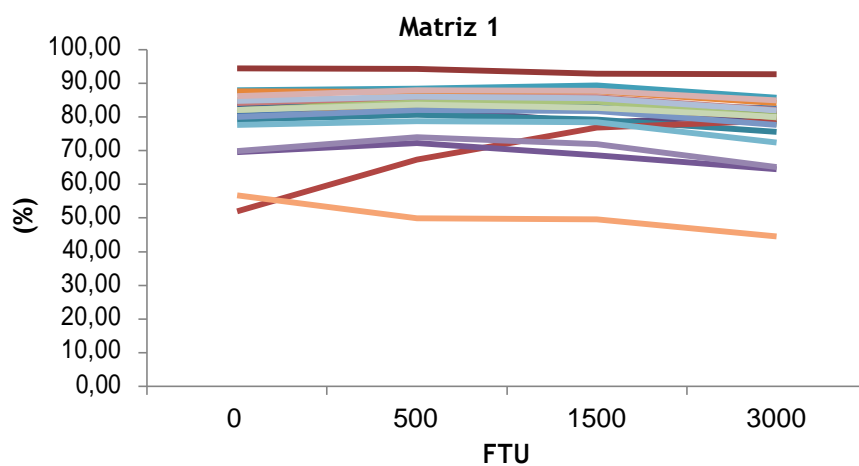


Figura 4 - Média da digestibilidade ileal dos aminoácidos essenciais (MAAE) e não essenciais (MAANE) em diferentes níveis de FTU



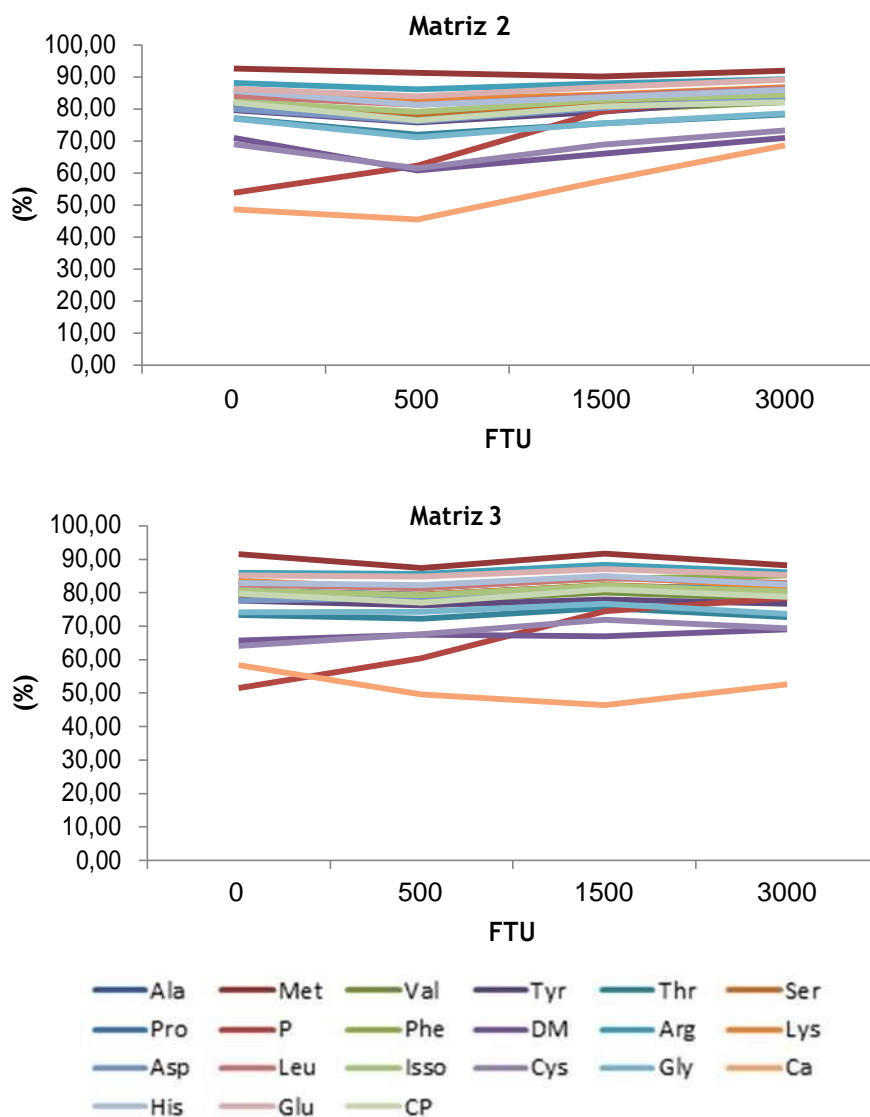


Figura 5 - Digestibilidade dos nutrientes em diferentes matrizes nutricionais suplementadas com níveis crescentes de FTU

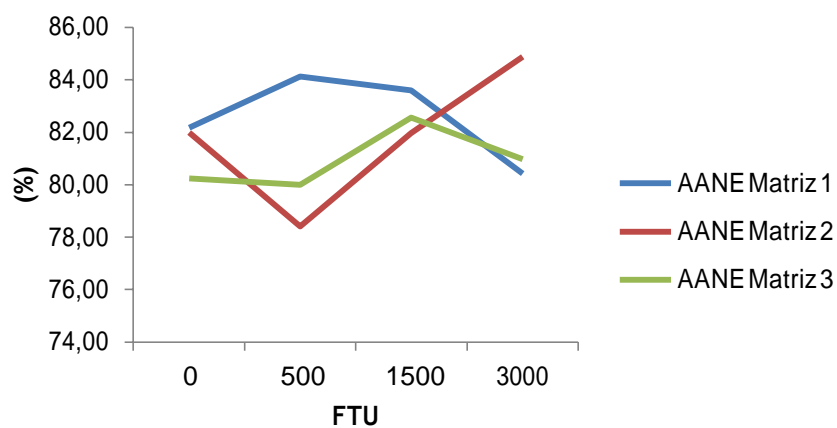


Figura 6 - Digestibilidade ileal dos aminoácidos não essenciais (AANE) em diferentes matrizes nutricionais em níveis crescentes de FTU

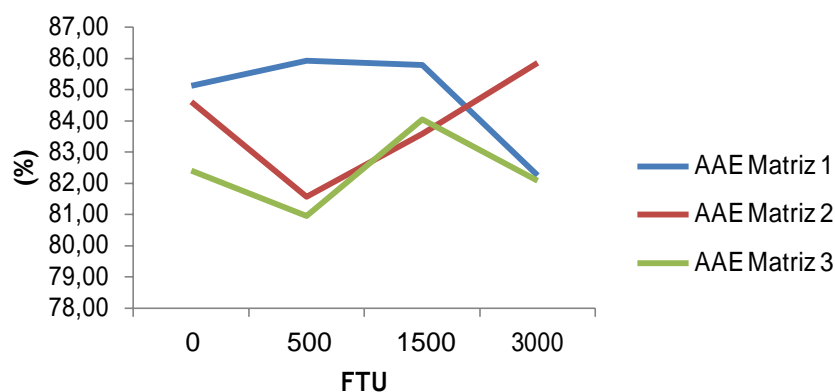


Figura 7 - Digestibilidade ileal dos aminoácidos essenciais (AAE) em diferentes matrizes nutricionais em níveis crescentes de FTU

Discussão

O presente trabalho foi executado a partir da hipótese que é possível reduzir a suplementação de aminoácidos na dieta para frangos de corte, valorizando a matriz nutricional do milho e do farelo de soja com o uso de uma superdosagem de fitase bacteriana, sem que haja o comprometimento do desempenho produtivo destes animais.

A enzima fitase foi suplementada com o intuito de disponibilizar o fósforo contido nas moléculas de ácido fítico, possibilitando uma redução quanto a suplementação das fontes alimentares que continham esse mineral.

No entanto, observou-se que a ação destas enzimas iria além deste benefício nutricional, surgindo assim novos conceitos e aplicabilidades deste aditivo.

Como exemplo, pode-se destacar a ação extra fosfórica da fitase observada durante o processo digestivo melhorando o aproveitamento dos minerais, aminoácidos e da energia (Selle & Ravindran, 2008), contribuindo ainda com a ação de enzimas endógenas essenciais no metabolismo (Liu et al., 2009), elevação das concentrações de carotenoides hepáticas, α -tocoferol, retinol e coenzima Q10 (Karadas et al., 2010).

Também pode interferir aumentando a sensibilidade do receptor de insulina do fígado de frango inibindo a expressão do gene do fator 1 de crescimento semelhante à insulina (Józefiak et al., 2010). Além disso, em frangos de corte saudáveis, a fitase aumentou a proliferação de linfócitos sanguíneos e níveis de IgA intestinal e células T citotóxicas (Liu et al., 2008). Todos esses estudos comprovam uma ação da fitase que vai além da simples disponibilidade do mineral fósforo encontrado nas moléculas de ácido fítico. A superdosagem de fitase na dieta de frangos corte tornou-se eficaz na criação de aves, estudos demonstram tais benefícios e recomendam a utilização destas

enzimas em níveis superiores aos utilizados anteriormente que era de 500FTU/kg (Walk et al., 2013; Walk et al., 2014; Manobhavan et al., 2016).

Analizando as dietas experimentais, pode-se observar que houve uma redução na suplementação de cálcio e de fósforo de acordo com o disponibilizado pela enzima fitase a um nível de 500FTU/kg, ou seja, 0,165% de cálcio e 0,150% de fósforo disponível. A redução destes minerais proporcionou uma piora no desempenho dos frangos de corte, o qual foi recuperado quando houve a adição da enzima fitase.

A redução, desde que não afete a relação entre Ca e P, é benéfica quando há a suplementação da fitase, explicado pelos resultados encontrados no presente estudo. Devido ao fato que se houvesse uma inadequada relação entre estes minerais, o efeito negativo de altos níveis de Ca ou uma relação desequilibrada de Ca:P na dieta poderia interferir negativamente nos resultados zootécnicos, devido ao poder de formar complexos insolúveis de Ca-Fitato, interagindo com proteínas e formando complexo de proteína-fítato (Selle e Ravindran, 2007), diminuindo assim a digestibilidade destes nutrientes tornando impossível a realização os ajustes nos níveis de aminoácidos, pois como relatado por Adedokun et al., 2018 altos níveis de Ca aumenta a excreção de aminoácidos em 39%, e isso impossibilitaria a redução nos níveis dos aminoácidos realizados nesse estudo. Nesse contexto é correto afirmar que para uma eficiência na suplementação de superdosagem a redução nos níveis de Ca e P contribui com a ação da fitase nos processos digestivos e metabólicos das aves. Assim, é possível a realização da redução quanto a suplementação de aminoácidos digestíveis nas dietas em até 10% do que se recomenda nas Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos.

Nesse estudo verificou-se que pelo menos os três primeiros aminoácidos limitantes podem sofrer essa redução. No entanto, para que esta redução não comprometa o desempenho produtivo dos animais a suplementação da enzima fitase deve ser realizada em uma superdosagem de 1500 FTU/kg e os níveis de cálcio e fósforo das dietas sejam ajustados de acordo com o disponibilizado na matriz enzimática.

O efeito extra fosfórico da fitase pode elucidar os resultados obtidos nesse estudo, e assim constatar que uma superdosagem dessa enzima permite que os níveis de aminoácidos digestíveis sejam reduzidos em dietas de frangos. Essa redução na exigência dos animais em até 10% dos aminoácidos digestíveis poderia estar relacionada com os resultados encontrados nas análises de morfometria intestinal, tendo em vista que a suplementação de fitase possibilitou uma melhor relação V:C.

Quanto maior a relação vilo:cripta maior é a área de absorção e melhor é o aproveitamento energético dos animais, essa relação é tida quando se observa maior altura de vilo e menor profundidade de cripta. Sendo assim, a superfície de contato do intestino é maior e a proliferação celular menor, indicando melhor saúde intestinal. O menor índice de proliferação celular permite que os valores energéticos que seriam utilizados no *turnover* das células intestinais sejam direcionados à produção (Moreira Filho et al., 2015). Nesse contexto pode-se afirmar que as exigências nutricionais dos animais diminuem quando uma renovação celular das células epiteliais também diminui. Pode haver também uma relação com o melhor aproveitamento energético, diminuindo os custos metabólicos para o organismo.

A presença do ácido fítico na dieta ainda está associada com uma maior excreção de sódio (Cowieson et al., 2004). Um dos prejuízos causados por alta excreção de sódio pode ser demonstrado na funcionalidade da bomba de sódio e potássio e em estudo realizado por Dilworth et al., (2005) foi relatado o detrimento da atividade da bomba de sódio quando os animais foram submetidos a dieta contendo ácido fítico, estes resultados foram sugeridos após a verificação dos níveis de glicose no sangue dos animais. Em estudo conduzido por Liu et al., (2008) verificou-se que houve um aumento nas concentrações de bombas de sódio e glicose nos enterócitos duodenais e jejunais de galinhas que foram alimentadas com dietas contendo a enzima exógena fitase. Assim, no trabalho realizado por Truong et al. (2014) foi proposto que a presença de fitato impede a absorção de glicose por agir na funcionalidade da bomba de sódio e potássio.

Foi demonstrado por Truong et al. (2015b) que a fitase proporciona uma melhor retenção de Na, e juntamente foi observado a melhora na digestibilidade de 16 aminoácidos após análise do conteúdo da digesta localizados no jejuno proximal das aves. Os autores sugerem que a maior retenção de Na tem relevância na digestão de aminoácidos e na absorção da glicose. Nesse contexto Truong et al., (2017) confirmaram a maior reabsorção de sódio ao longo do intestino delgado, quando utiliza-se fitase nas dietas, aumentando a disponibilidade deste mineral para co-transporte de nutrientes conduzidos pela bomba de sódio. No trabalho citado o nível de 2000 FTU/kg de fitase proporcionou uma melhora no ganho de peso dos animais quando a enzima foi suplementada ao controle negativo.

A melhora no desempenho dos animais alimentados com dietas contendo a superdosagem de fitase pode ser explicada analisando a área do vilo (ARV, μm). Esta

variável está relacionada com a capacidade de absorção dos nutrientes no intestino dos animais tendo em vista que a principal porta de absorção dos nutrientes localiza-se nas células enterócitas situadas nas microvilosidades do trato gastrointestinal.

A ARV é determinada pela altura e a largura do vilo, subtende que uma maior área de vilo haverá maior concentração de células absorptivas proporcionando uma maior porta de entrada de nutrientes. À medida que houve um aumento na suplementação de fitase a um nível de 1500 FTU/kg, aos 45 dias, permitiu-se diminuir em 10% os aminoácidos digestíveis da dieta.

O que provavelmente ocorre com a suplementação da superdosagem de fitase é uma melhoria no aparelho digestório das aves, o qual pode estar relacionada com uma melhoria na saúde intestinal. Uma melhor relação vilo:cripta e uma área de absorção maior são indicativos de uma menor proliferação celular, indicativos estes que demonstram um efeito benéfico da fitase principalmente em doses altas.

Segundo Beeson et al. (2017) o aumento da hidrólise de fitato pode melhorar o desempenho geral e a eficiência da utilização de nutrientes, aumentando assim a eficiência da produção para os avicultores. Essa melhora na hidrólise do fitato diminui o poder antinutricional que esta molécula desempenha no organismo. Liu et al., (2009) avaliando a presença de fitato em diferentes concentrações e a suplementação da fitase em níveis crescentes de FTU em dietas para aves puderam verificar o efeito anti nutricional do fitato nas secreções e atividades das enzimas endógenas dos frangos de corte, sendo que o nível maior de fitato diminuiu a atividade da tripsina e da pepsina estando a ação destas recuperadas com a adição de fitase. Os autores ainda demonstram interações significativas entre fitato e fitase nas expressões de mRNA de grelina, somatostatina e S6K no jejuno. Os resultados sugerem que o fitato e a fitase podem influenciar o sistema gastrointestinal endócrino e exócrino, bem como a rede regulatória periférica de crescimento em frangos de corte. Walk et al., (2013) sugerem que a melhoria no desempenho, no teor de cinza de osso, digestibilidade dos aminoácidos, e no metabolismo de energia com a suplementação de maior teor de fitase pode estar associado a hidrólise de fitato, reduzindo o efeito quelante antinutricional do fitato liberando o P, os autores recomendam uma suplementação de 1500 FTU/kg em dietas com redução nos níveis de cálcio, tais resultados corroboram os encontrados no presente estudo.

Os resultados de digestibilidade ileal mostram que a superdosagem de fitase é eficaz na digestão dos nutrientes. A concentração de fósforo na digesta foi afetado

significativamente com o aumento na suplementação de FTU em todas as matrizes nutricionais, assim, houve uma maior disponibilidade deste mineral comprovando a eficácia da enzima em liberar o fósforo fítico. A enzima age em função da presença do substrato, o fitato, e ocorre na hidrólise e liberação dos fósforos contidos na molécula do ácido fítico. Teoricamente, a hidrólise enzimática completa do fitato gera uma série de fosfatos de mio-inositol menores ($IP6 \rightarrow IP5 \rightarrow IP4 \rightarrow IP3 \rightarrow IP2 \rightarrow IP1$), por meio de uma cadeia de reações de desfosforilação, para produzir o mio-inositol e seis P inorgânicos (Greiner et al. 2002). Vale salientar que a enzima pode agir em várias moléculas de ácido fítico, não limitando sua ação, nesse contexto a superdosagem garante maior concentração de fitase no organismo tornando o processo mais eficiente hidrolisando eficientemente a molécula de fitato.

Em geral o cálcio apresentou uma melhor disponibilidade. Analisando a suplementação da superdosagem de fitase na matriz 2, que tinha redução de 5% dos aminoácidos, houve um aumento da absorção deste mineral, sugerindo assim que para haver um melhor aproveitamento deste mineral a relação entre aminoácidos e cálcio deve existir associado ainda a uma superdosagem de fitase para uma melhor eficiência digestiva.

Uma superdosagem de fitase promove significativamente uma melhor digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais quando ocorre uma redução nutricional nas matrizes, destacando que na matriz 2 essa digestibilidade é mais significativa. Já para a matriz 1 que não havia déficit de aminoácidos essa digestibilidade decresceu, provavelmente por haver uma sobre carga de aminoácidos quando a superdosagem de fitase é administrada nas dietas.

Os dados da digestibilidade comprovaram que há eficiência da superdosagem da enzima, possibilitando assim reduzir a quantidade de aminoácidos da dieta, valorizando os nutrientes presentes no milho e na soja. Nesse contexto, afirma-se ainda que a redução na suplementação dos aminoácidos essenciais suplementando uma superdosagem de 1500FTU/kg não afetou o pool de aminoácidos necessários para a formação dos aminoácidos não essenciais.

No presente estudo não foi verificada a relação entre lisina e os demais aminoácidos da dieta, como conhecido pelos nutricionistas na formulação de dietas, seguindo o conceito de proteína ideal. Assim, novos estudos podem ser formulados levando em consideração a relação dos aminoácidos da dieta com a redução de 10% de lisina digestível e suplementação de superdosagem de fitase.

Conclusão

É possível reduzir o cálcio e o fósforo, e até 10% dos três primeiros aminoácidos limitantes para frangos de corte, quando suplementados com uma superdosagem de fitase bacteriana de 1500FTU/kg.

Referências Bibliográficas

- Adedokun, S.A., Pescatore, A.J., Ford, M.J., Ao, T., Jacob, J.P. 2018. Investigating the effect of dietary calcium levels on ileal endogenous amino acid losses and standardized ileal amino acid digestibility in broilers and laying hens. *Poult. Sci.* 97, 131-139.
- AOAC. 1970. Animal Feeds. Phosphorus 7.095–7.098. Photometric method. Page 125 in *Official Methods of Analysis*. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC.
- AOAC. 2006. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC.
- Beeson, L.A., Walk, C.L., Bedford, M.R., Olukosi, O.A. 2017. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. *Poult. Sci.* 96, 2243-2253.
- Cowieson, A.J., Acamovic, T., Bedford, M.R. 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45, 101-108.
- Dilworth, L.L., Omoruyi, F.O., Asemota, H.N. 2005. Digestive and absorptive enzymes in rats fed phytic acid extract from sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Diabetol. Croat.* 34, 59–65.
- Engelen, A.J., Heeft, F.C.V., Randsdorp, P.H.G., Somers, W.A.C., Schaefer, J., Vat, B.J.V. 2001. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: Collaborative interlaboratory study. *J. Assoc. of. Anal. Chem. Int.* 84, 629–633.
- Filho, A.L.B.M., Oliveira, C.J.B., Oliveira, H.B., Campos, D.B., Guerra, R.B., Costa, F.G.P., Givisiez, P.E.N. 2015. High Incubation Temperature and Threonine Dietary Level Improve Ileum Response Against Post-Hatch *Salmonella* Enteritidis Inoculation in Broiler Chicks. *Plos one.* 10.
- Greiner, R., Farouk, A., Alminger, M.L., Carisson, N.G. 2002. The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. *Canadian Journal of Microbiology.* 48, 986-994.

Józefiak, D., Ptak, A., Kaczmarek, S., Maćkowiak, P., Sassek, M., Slominski, B.A. 2010. Multi-carbohydrase and phytase supplementation improves growth performance and liver insulin receptor sensitivity in broiler chickens fed diets containing full-fat rapeseed. *Poultry Sci.* 89, 1939–1946.

Karadas, F., Pirgozliev, V., Pappas, A.C., Acamovic, T., Bedford, M.R. 2010. Effects of different dietary phytase activities on the concentration of antioxidants in the liver of growing broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94, 519–526.

Liu, N., Ru, Y.J., Li, F.D., Cowieson, A.J. 2008. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens. *Journal of Animal Science.* 86, 3432–3439.

Liu, N., Ru, Y.J., Li, F.D., Wang, J., Lei, X. 2009. Effect of dietary phytate and phytase on proteolytic digestion and growth regulation of broilers. *Arch. Anim. Nutr.* 63:292–303.

Manobhavan, M., Elangovan, A.V., Sridhar, M., Shet, D., Ajith, S., Pal, D.T., Gowda, N.K. 2016. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broiler fed corn-soya-based diets. *J Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100, 93–100.

Morgan, N.K., Walk, C.L., Bedford, M.R., Scholey, D.V., Burton, E.J. 2016. Effect of feeding broilers diets differing in susceptible phytate content. *Animal Nutrition.* 2, 33–39.

Perkin Elmer Instruments. 1998. Notes on mineral analysis using flame atomic absorption. Pages 64–65 in *Analyst 800 Atomic Absorption Spectrophotometer User's Guide*. Perkin Elmer Instruments, Ueberlingen, Germany.

Ramos, A.H., Santos, L.M., Miglino, M.A., Peres, J.A., Guerra, R.R. 2011. Biometria, histologia e morfometria do sistema digestório do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre. *Biotemas.* 24, 111–119.

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D. C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F. 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. UFV, Viçosa, MG.

SAS. 2011. SAS STAT 9.3. User's' Guide. Cary, NC, SAS Institute Inc. p.261.

Selle, P.H., Ravindran, V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam. 135, 1–41.

Selle, P.H., Ravindran, V. 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science.* 113, 99–122.

Truong, H.H., Shukun, Y., Moss, A.F., Partridge, G.G., Liu, S.Y., Selle, P.H. 2017. Phytase inclusions of 500 and 2000 FTU/kg in maize-based broiler diets impact on growth performance, nutrient utilisation, digestive dynamics of starch, protein (N), sodium and IP₆ phytate degradation in the gizzard and four small intestinal segments. *Anim. Feed Sci. Technol.* 223, 13-22.

Truong, H.H., Yu, S., Peron, A., Cadogan, D.J., Khoddami, A., Roberts, T.H., Liu, S.Y., Selle, P.H. 2014. Phytase supplementation of maize-, sorghum- and wheat-based broiler diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP₆) and sodium jejunal and ileal digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 198, 248-256.

Truong, H.H., Bold, R.M., Liu, S.Y., Selle, P.H. 2015b. Standard phytase inclusion in maize-based broiler diets enhances digestibility coefficients of starch, amino acids and sodium in four small intestinal segments and digestive dynamics of starch and protein. *Anim. Feed Sci. Technol.* 209, 240-248.

Walk, C.L., Bedford, M.R., Santos, T.S., Paiva, D., Bradley, J.R., Wladecki, H., Honaker, C., Mcelroy, A.P. 2013. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. *Poult. Sci.* 92 :719–725.

Walk, C.L., Santos, T.T., Bedford, M.R. 2014. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers, *Poult. Sci.* 93, 1172-1177.

Williams, C.H., David, D.J., Iismaa, O. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci.* 59:381–385.

CAPÍTULO 3

Superdosagem de fitase bacteriana (*EC 3.1.3.26*) em dietas de poedeiras leves

Superdosagem de fitase bacteriana (*EC 3.1.3.26*) em dietas de poedeiras leves

Resumo: O objetivo do presente estudo foi avaliar a suplementação de fitase exógena em uma superdosagem para poedeiras leves no segundo ciclo de produção. Foram utilizados 320 poedeiras leves da linhagem Hy-line W-36, com idade entre 44 a 64 semanas, divididas em cinco tratamentos distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições e oito aves cada. As dietas foram formuladas para atender as exigências das aves baseada no manual de criação sendo elas iso proteicas e iso energéticas. Para atender os níveis de 0, 500, 1000, 1500 e 3000 de FTU/kg, o inerte foi substituído por doses da enzima fitase nas seguintes proporções de zero, 0,100; 0,200; 0,300 e 0,600 kg/ton. As variáveis analisadas foram desempenho das aves e qualidade dos ovos, morfometria intestinal e do epitélio do magno, concentração de glicogênio e grau de esteatose hepática, e quantidade de dobras do útero. Realizou-se análise de variância e para os efeitos dos níveis de FTU utilizou-se a análise de regressão a 5% de probabilidade. Nos ajustes de regressão quadrática derivou-se as equações estimando-se os valores de máxima e mínima nos níveis de suplementação de fitase. Para as variáveis de concentração de glicogênio, esteatose hepática e de dobras uterinas utilizou-se a análise multivariada de regressão logística ordinal pelo procedimento logit cumulativo para estimar as probabilidades relativas dos scores adotados nas variáveis dentro dos níveis de FTU. Observa-se diferença significativa entre os níveis de suplementação de fitase com ajuste de modelo quadrático para as variáveis: Peso do ovo (g), massa de ovo (g/ave/dia), conversão por massa de ovo (g/g), concentração de gema (%) e albúmen (%), espessura (μm) e resistência de casca (kgf), gravidade específica e cor da gema, e possibilitou uma melhora no aparelho digestivo das aves proporcionando uma melhor relação vilo:cripta, já para a espessura do epitélio do magno (μm) houve efeito linear, ou seja, quanto maior o nível de suplementação de fitase mais espesso foi o epitélio do mango. Nas variáveis de concentração de glicogênio, esteatose hepática e de dobras do útero a superdosagem de fitase proporciona maiores reservas energéticas no fígado e úteros com maior quantidade de dobras secundárias e terciárias caracterizando uma melhor eficiência do órgão, já para o score de esteatose hepática a superdosagem possibilitou uma maior probabilidade de surgimento do grau 1 de esteatose. Verificando os efeitos benéficos da superdosagem recomenda-se a suplementação de 1500 FTU/kg de fitase bacteriana em dietas a base de milho e farelo de soja para poedeiras leves de 44 a 64 semanas de produção.

Palavras-chave: glicogênio hepático, metabolismo energético, morfometria intestinal, magno, útero.

Superdosing of bacterial phytase (EC 3.1.3.26) in laying hens diets

Abstract: The objective of the present study was to evaluate the exogenous phytase supplementation in an superdosing for light laying hens in the second production cycle. A total of 320 light-weight hens of the Hy-line W-36 strain, aged 44 to 64 weeks, were divided into five treatments in a completely randomized design with eight replicates and eight birds each. The diets were formulated to meet the requirements of the birds based on the breeding manual being they iso protein and iso energetic. To meet the levels of 0, 500, 1000, 1500 and 3000 FTU / kg, the inert was replaced with doses of the phytase enzyme in the following ratios of zero, 0.100; 0.200; 0.300 and 0.600 kg / ton. The variables analyzed were poultry performance and egg quality, intestinal morphometry and magnum epithelium, glycogen concentration and degree of hepatic steatosis, and number of folds of the uterus. An analysis of variance was performed and for the effects of FTU levels, the regression analysis at 5% of probability was used. In the quadratic regression adjustments, the equations were derived by estimating the maximum and minimum values in the levels of phytase supplementation. For the variables of glycogen concentration, hepatic steatosis and uterine folds, the multivariate analysis of ordinal logistic regression using the cumulative logit procedure was used to estimate the relative odds of the scores adopted in the variables within the FTU levels. A significant difference was observed between the levels of phytase supplementation with quadratic model adjustment for the variables: Egg weight (g), egg mass (g / bird / day), egg mass (g / g) conversion, (%), thickness (μm) and bark resistance (kgf), specific gravity and yolk color, and allowed an improvement in the digestive tract of the birds, providing a better relationship: crypt, already the thickness of the magnetite epithelium (μm) was linear, that is, the higher the level of phytase supplementation was the mango epithelium. In the variables of glycogen concentration, hepatic steatosis and uterine folds, phytase superdosing provides greater energetic reserves in the liver and uterus with a greater number of secondary and tertiary folds characterizing a better organ efficiency, as well as for the hepatic steatosis score and superdosing made it possible for steatosis grade 1 to appear. To verify the beneficial effects of superdosing, it is recommended to supplement 1500 FTU / kg of bacterial phytase in corn and soybean meal diets for lightweight laying hens from 44 to 64 weeks of production.

Keywords: hepatic glycogen, energy metabolism, intestinal morphometry, magnus, uterus.

Introdução

A utilização de enzimas exógenas nas dietas das aves surgiu com o intuito de potencializar a produção animal reduzindo custos de produção e com um potencial de neutralizar efeitos antinutricionais que algumas substâncias contidas nos ingredientes poderiam causar aos animais. Aliado a esta situação houve um maior aproveitamento dos alimentos tornando-lhes disponíveis aos processos digestivos e metabólicos das aves, diminuindo a excreção de substâncias nocivas ao meio ambiente.

Dentre as enzimas utilizadas pode-se destacar a ação da fitase, a qual atua catalisando e hidrolisando moléculas dos fitatos, geralmente produzindo inositol, inositol monofosfato e fosfato inorgânico, aumentando a disponibilidade de fósforo para a absorção (Casey & Walsh, 2004). No entanto verificou-se que o fitato causa efeitos negativos sobre a digestão e absorção de outros minerais, aminoácidos e energia (Gautier et al., 2018), além de atuar como fator irritante sobre o intestino, o que leva a maiores perdas endógenas (Selle & Ravindran, 2007). Assim, novos conceitos voltados para o uso da enzima surgiram com o avançar das pesquisas tendo em vista que os efeitos extra fosfóricos das fitases proporcionaram utiliza-la com outras finalidades além da liberação do fósforo presente nas moléculas de ácido fítico.

Sabe-se que existe uma ação extra fosfórica da enzima fitase observada durante o processo digestivo dos animais que possibilita a adição destas enzimas nas dietas com intuito de melhorar a digestibilidade de minerais, aminoácidos e energia (Selle & Ravindran, 2008), contribuindo ainda com a ação de enzimas endógenas essenciais no metabolismo (Liu et al., 2009), elevação das concentrações de carotenoides hepáticas, α -tocoferol, retinol e coenzima Q10 (Karadas et al., 2010). Pode interferir aumentando a sensibilidade do receptor de insulina do fígado de frango inibindo a expressão do gene do fator 1 de crescimento semelhante à insulina (Józefiak et al., 2010). Baseado nestes benefícios proporcionado ao metabolismo o conceito de superdosagem de fitase vem sendo trabalhado para determinar um ideal nível de suplementação desta enzima nas dietas das aves.

Apesar dos avanços conhecidos no uso da superdosagem de fitase, poucos trabalhos vêm sendo realizado com poedeiras comerciais. Tendo como hipótese que a suplementação de fitase hidrolisa as moléculas de ácido fítico aumentando a digestibilidade e disponibilidade de minerais, aminoácidos e energia, contribuindo com o desenvolvimento do trato digestível das aves melhorando o desempenho produtivo dos animais por ter influência no aparelho reprodutor das poedeiras, assim o objetivo do

presente estudo foi avaliar a suplementação de fitase exógena em uma superdosagem para poedeiras leves no segundo ciclo de produção (44 a 64 semanas)

Material e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, certidão de aprovação n°023/2017.

Desenho experimental, instalações e dietas.

O experimento foi realizado no Módulo de Avicultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, localizado no município de Areia – PB, Brasil. As condições ambientais de temperatura e umidade relativa do ar foram registradas diariamente durante todo experimento com média de 26°C e umidade relativa de 87%.

Foram utilizados 320 poedeiras leves da linhagem Hy-line W-36, com idade entre 44 a 64 semanas, totalizando 20 semanas de experimento, com produtividade média inicial de 94%, divididos em cinco tratamentos distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições e oito aves cada. A fitase utilizada é derivada de bactéria *Escherichia coli* e classificada como 6-fitase (EC 3.1.3.26).

As aves foram alojadas em galpão convencional de postura, coberto com telhas de barro, com comedouros tipo calha e bebedouros tipo nipple, sendo agrupadas em gaiolas de arame galvanizado com dimensões de 45 cm X 45 cm X 30 cm, recebendo água e ração à vontade. O programa de luz adotado foi o recomendando pelo manual de criação Hy-line W36 – 2015, sendo 16 horas por dia dividido em 12 horas naturais e 4 horas artificiais feitas por lâmpadas fluorescentes de forma contínua.

As dietas foram formuladas para atender as exigências nutricionais dos animais de acordo com o manual de criação (Hy-line, 2015), sendo elas iso proteicas e iso energéticas. Para atender os níveis de 0, 500, 1000, 1500 e 3000 de FTU/kg, o inerte foi substituído por doses da enzima fitase nas seguintes proporções de zero, 0,100; 0,200; 0,300 e 0,600 kg/ton (Tabela 01).

Tabela 01 – Dietas experimentais com superdosagem de fitase bacterina para poedeiras leves no segundo ciclo de produção (44 a 64 semanas).

Ingredientes (kg)	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Milho, 7,88%			586,890		
Farelo de Soja, 45,22%			249,390		
Óleo de Soja			30,000		
Calcário			103,820		
Fosfato BI 18,5%			19,940		
Sal			2,430		
DL-Metionina			2,120		
L-Lisina HCl			0,350		
L-Valina			0,050		
Bicarbonato de Na			2,840		
Cloreto de Colina			0,700		
Premix Mineral ¹			0,500		
Premix Vitaminico ²			0,250		
Antioxidante ³			0,100		
Colistina			0,020		
Inerte ⁴	0,600	0,500	0,400	0,300	0,000
Fitase ⁵	0,000	0,100	0,200	0,300	0,600
Total (ton)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Composição nutricional					
FTU/kg	0	500	1000	1500	3000
Energia Metabolizável, kcal/kg			2822,000		
Proteína Bruta, %			16,060		
Met + Cis dig, %			0,660		
Met dig, %			0,433		
Lisina dig, %			0,780		
Treonina dig, %			0,550		
Valina dig, %			0,690		
Isoleucina dig, %			0,620		
Leucina dig, %			1,324		
Arginina dig, %			0,990		
Triptofano dig, %			0,174		
Ca, %			4,480		
P disp, %			0,490		
Cl, %			0,210		
Na, %			0,190		
K, %			0,627		
Ácido Fólico %			0,198		
BE, mEq/kg			183,650		

¹Pré-mistura mínima por quilograma de alimento: Mn: 60 g; Fe: 80 g; Zn: 50 g; Cu: 10 g; Co: 2 g; I: 1 g, selênio: 250 mg.

²Pré-mistura de vitaminas por quilograma de ração: vitamina A: 15 000 000 UI; vitamina D3: 1.500.000 UI; vitamina E: 15 000 UI; vitamina B1: 2,0 g; vitamina B2: 4,0 g; vitamina B6: 3,0 g; vitamina B12: 0,015 g; ácido nicotínico: 25 g; ácido pantotênico: 10 g; vitamina K3: 3,0 g; ácido fólico: 1,0 g.

³Etoxiqum

⁴Areia lavada

⁵Quantum Blue 5000; Contribuição da enzima suplementando 500 FTU: Fósforo disponível 0,150%, Cálcio 0,165%, Sódio 0,035%, Lisina 0,017%, Metionina 0,004%, Cistina 0,035%, Treonina 0,033%, Proteína Bruta 0,421%, Energia Metabolizável 52kcal/kg

Variáveis analisadas

Nos 15 dias que antecederam o início do experimento a produção das aves foi registrada servindo como base para a distribuição e homogeneização das parcelas experimentais.

O período experimental foi dividido em 5 subperíodos de 28 dias. A coleta dos ovos realizava-se diariamente no período da tarde após registro de produção de cada parcela, em caso de mortalidade realizava-se as devidas correções. Nos três últimos dias de cada subperíodo todos os ovos foram pesados e a partir do peso médio selecionou-se seis ovos por parcela, sendo 3 destinados a análise de qualidade dos ovos, 2 para análise de gravidade específica e 1 para resistência de casca, totalizando assim 720 ovos analisados por tratamento no final do experimento (6 ovos x 3 dias x 8 repetições em 5 subperíodos).

Desempenho e Qualidade dos ovos

As variáveis de desempenho e qualidade dos ovos estudados foram: consumo de ração (g/ave/dia), produtividade (%), peso do ovo (g), massa de ovo (g/ave/dia), conversão por massa (kg/kg) e por dúzia de ovos (kg/dz), porcentagens (%) de gema, albúmen e casca, espessura da casca (μm), unidade Haugh, cor da gema, gravidade específica (g/cm^3), resistência da casca (kgf) e a viabilidade (%).

Morfometria Intestinal

No final do experimento uma ave por repetição foi escolhida no peso médio da parcela e eutanasiada para posterior coleta de material biológico. Procedeu-se à coleta de um fragmento de 1 cm da porção média do duodeno de cada ave, perfazendo 8 fragmentos por tratamento, o qual foi fixado por imersão em formol a 10%. Os fragmentos do tecido foram inclusos em parafina segundo processamento histológico padrão (Ramos et al., 2011). Realizou-se em seguida a microtomia a 5 micrômetros de espessura de cada bloco de parafina, sendo tais lâminas histológicas submetidas à coloração de “[Periodic Acid Schiff](#)” (PAS) e digitalizada em câmera Motic acoplada em microscópio Olympus BX-53 com o programa analisador de imagens Motic Image Plus 2.0. Para cada fotomicrografia foram realizadas três mensurações de altura de vilosidade intestinal e de sua respectiva cripta, perfazendo um número amostral de 72 mensurações (8 animais x 3 fotomicrografias x 3 mensurações) para cada variável supracitada por tratamento. A altura de vilo (AV, μm) foi tomada a partir da região da mucosa intestinal que coincidia com a porção superior das criptas, até seu ápice. A profundidade de cripta

(PC, μm) foi medida considerando a distância entre a sua base até a região de transição cripta-vilosidade. A relação vilo:cripta (V:C) foi determinada pela relação da altura do vilo pela a profundidade da cripta. As análises histomorfométricas foram realizadas por um único histologista para evitar erros de interpretação.

Glicogênio e Esteatose Hepática

Foi utilizado o mesmo procedimento padrão de processamento histológico e de captura já citado para a morfometria intestinal. Procedeu-se à coleta de um fragmento de $0,5\text{ cm}^3$ do lobo lateral esquerdo do fígado de cada ave, perfazendo 8 fragmentos por tratamento. Para avaliação do score de glicogênio e esteatose hepática, atribui-se um escore de avaliação para cada fígado analisado através de fotomicrografias hepáticas de cada animal. As lâminas histológicas também foram coradas com PAS.

Na avaliação da concentração de glicogênio e score de esteatose hepática utilizou-se 4 fotomicrografias para cada animal, totalizando um número amostral de 32 (8 animais x 4 fotomicrografias), as quais foram analisadas atribuindo um escore para o grau de concentração de glicogênio e esteatose. Para a concentração de glicogênio atribui-se scores de acordo com a presença de glicogênio no fígado das aves sendo que 0 (ausência de positividade), 1 (pouca positividade), 2 (positividade moderada) e 3 (positividade intensa). Já para o grau de esteatose hepática os escores foram definidos considerando a quantidade e o tamanho dos vacúolos citoplasmáticos lipídicos dos hepatócitos na coloração PAS, sendo: 0 (ausência de esteatose), 1 (pouca esteatose), 2 (esteatose moderada) e 3 (esteatose avançada), seguindo de forma modificada o Score Semi Quantitativo de Ishak (Ishak et al., 1995).

Morfometria de Magno

Foi utilizado o mesmo procedimento padrão de processamento histológico e de captura de imagem já citado anteriormente. Procedeu-se à coleta de um fragmento de 1 cm da região média e mais espessa do magno por animal, perfazendo 8 fragmentos por tratamento. As lâminas histológicas também foram coradas com a coloração de PAS. Para avaliação morfométrica do magno utilizou-se 2 fotomicrografias para cada animal, totalizando um número amostral de 16 (8 animais x 2 fotomicrografias). Neste material foram avaliadas as dobras do magno, a maturação das glândulas e a espessura do epitélio do magno. Para a mensuração do epitélio do magno foi realizada uma mensuração em cada fotomicrografia digitalizada, sendo assim o número amostral de 16 mensurações por tratamento.

Dobras do Útero

Foi utilizado o mesmo procedimento padrão de processamento histológico e de captura de imagem já citado anteriormente. Procedeu-se a coleta de um fragmento de 1 cm³ da região média do útero por animal, perfazendo 8 fragmentos por tratamento. As lâminas histológicas também foram coradas pela coloração de PAS, sendo digitalizadas duas fotomicrografias por animal, totalizando um número amostral de 16 (8 animais x 2 fotomicrografias), as quais foram analisadas atribuindo um score para o grau de ramificação das dobras do útero, sendo: 0 (poucas dobras secundárias), 1 (dobras secundárias moderadas), 2 (dobras secundárias intensas) e 3 (dobras secundárias e terciárias moderadas), 4 (dobras secundárias e terciárias intensas) seguindo de forma modificada a metodologia do Score Semi Quantitativo de Ishak (Ishak et al., 1995).

Análise Estatística

Foi utilizado o software SAS (SAS Institute, 2011) para as análises estatísticas das variáveis de desempenho, qualidade de ovos e morfometria do aparelho digestivo (duodeno) e reprodutor das poedeiras (magno). Realizou-se análise de variância e para os efeitos dos níveis de FTU utilizou-se a análise de regressão a 5% de probabilidade. Quando significativo as equações são demonstradas, e em ajuste de regressão quadrática derivou-se as equações estimando-se os valores de máxima e mínima dos níveis de suplementação de fitase.

Foi utilizado o software estatístico R versão 3.5.1 para a análise de score de glicogênio hepático, de esteatose hepática e dobras do útero. Para tanto procedeu-se com a análise multivariada de regressão logística ordinal pelo procedimento logit cumulativo para estimar as probabilidades relativas dos escores adotados nas variáveis dentro dos níveis de suplementação de FTU nas dietas pela distribuição multinomial dos dados. As técnicas de regressão ordinal modelam as probabilidades cumulativas de que uma dada resposta (Y) se situa dentro ou abaixo de uma dada categoria (j) para todos os valores possíveis de j (Agresti, 1996). Quando significativo gerou-se gráficos para demonstrar o comportamento dos dados.

Resultados

Desempenho e qualidade dos ovos

Na tabela 02 estão descritos os resultados das variáveis de desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras leves com idade entre 44 a 64 semanas alimentadas com superdosagem de fitase bacteriana (EC 3.1.3.26). Verifica-se que houve efeito

significativo entre os tratamentos para as variáveis: peso do ovo ($P = 0,0166$), massa de ovo ($P = 0,0056$), conversão alimentar por massa de ovo ($P = 0,0168$), gema % ($P = 0,0442$), albúmen % ($P = 0,0078$), cor da gema ($P = 0,0502$), gravidade específica ($P < 0,0001$) e resistência de casca ($P = 0,0249$). Em todas as variáveis citadas a regressão ajustou-se ao modelo quadrático, e após derivada das equações estimou-se os níveis de suplementação da fitase. Para peso do ovo estima-se que suplementando 1643 FTU/kg haveria ovos mais pesados, já uma maior massa de ovo ocorreria com uma suplementação de 1450 FTU/kg, para uma melhor conversão por massa de ovo a suplementação 1250 FTU/kg apresentaria uma melhor conversão. Para a concentração de gema e albúmen estima-se um valor máximo destes componentes do ovo ao suplementar 1333 e 1500 FTU/kg respectivamente, para as variáveis analisadas de espessura de casca e resistência a quebra estima-se que o melhor nível de suplementação de fitase seria respectivamente de 1217 e 750 FTU/kg. A suplementação de 1750 FTU/kg promoveria uma maior gravidade específica dos ovos, e estima-se que 1875 FTU/kg de suplementação de fitase promoveria ovos com uma maior pigmentação nas gemas.

Tabela 02 - Desempenho e qualidade de ovos de poedeiras leves no segundo ciclo de produção, alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5	CV	VALOR	REGRESSÃO	
Nível de FTU	0	500	1000	1500	3000	(%)	P	L	Q
Consumo de ração (g/ave/dia)	107,91	108,44	106,34	107,03	106,89	1,76	0,2062	0,1725	0,319
Produtividade (%)	89,43	90,07	89,99	89,39	87,75	2,84	0,3793	0,0912	0,3114
Peso do ovo (g)	64,17	65,19	65,87	66,03	64,97	1,50	0,0166	0,2506	0,0023
Massa de Ovo (g/ave/dia)	57,37	58,70	59,12	59,57	56,98	2,31	0,0056	0,2396	0,0005
Conversão por massa de ovo (kg/kg)	1,89	1,86	1,80	1,81	1,87	2,84	0,0168	0,8243	0,0013
Conversão por dúzia de ovo (kg/dz)	1,45	1,44	1,43	1,43	1,46	3,00	0,5733	0,4729	0,1676
Gema (%)	26,44	26,20	25,89	25,97	26,61	2,15	0,0442	0,3407	0,0072
Albúmen (%)	64,17	64,36	64,82	64,74	64,01	1,02	0,0809	0,481	0,0078
Casca (%)	9,36	9,39	9,27	9,27	9,35	2,18	0,6658	0,7425	0,2552
Espessura de casca (μm)	385,33	389,61	391,54	388,64	380,79	1,94	0,0076	0,1077	0,0311
Resistência de casca (kgf)	3,19	3,39	3,36	3,3	2,71	10,69	0,0249	0,0061	0,0296
Cor da gema	6,66	6,78	6,90	6,81	6,71	2,43	0,0502	0,9823	0,0059
Gravidade Específica	1,080	1,083	1,086	1,089	1,080	0,32	<0,0001	0,8956	<0,0001
Unidade Haugh	81,37	80,89	81,12	81,17	80,26	1,78	0,5965	0,1628	0,6484
Viabilidade (%)	98,43	98,21	100	98,21	97,65	4,16	0,8291	0,6316	0,5733

(Peso do ovo: $y = -0,0000007x^2 + 0,0023x + 64,2$; R^2 0,99; Max: 1643 FTU/kg), (Massa de ovo: $y = -0,000001x^2 + 0,0029x + 57,399$; R^2 0,99; Max 1450 FTU/kg), (Conversão por massa de ovo: $y = 0,00000004x^2 + 0,0001x + 1,8968$; R^2 0,94; Min 1250 FTU/kg), (Gema %: $y = 0,0000003x^2 + 0,0008x + 26,459$; R^2 0,97; Min: 1333 FTU/kg), (Albúmen %: $y = -0,0000003x^2 + 0,0009x + 64,127$; R^2 0,93; Max: 1500 FTU/kg), (Espessura de Casca: $y = -0,000003x^2 + 0,0073x + 386$; R^2 0,93 Max 1217 FTU/kg), (Resistência: $y = -0,0000002x^2 + 0,0003x + 3,2277$; R^2 0,98; Max 750 FTU/kg), (Gravidade específica: $y = -0,000000002x^2 + 0,00001x + 1,0802$; R^2 0,99; Max: 1750 FTU/kg), (Cor de gema: $y = -0,00000008x^2 + 0,0003x + 6,6756$; R^2 0,81; Max: 1875 FTU/kg).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos sob a suplementação dos níveis da fitase para as variáveis: consumo de ração ($P = 0,2062$), produtividade ($P = 0,3793$), conversão alimentar por dúzia ($P = 0,5733$), casca % ($P = 0,6658$), unidade haugh ($P = 0,5965$) e na viabilidade ($P = 0,8291$), (Tabela 02).

Morfometria Intestinal e aparelho reprodutivo

Na Tabela 03 estão descritos os dados das análises de morfometria do duodeno de poedeiras, (profundidade de cripta - PC (μm), altura de vilo - AV (μm), relação vilo:cripta - V:C (μm)), e do epitélio do magno - EPM (μm).

Houve efeito dos níveis de FTU com ajuste de regressão quadrático para as variáveis morfométricas do duodeno de poedeiras leves no segundo ciclo de produção ($P < 0,0001$). Estima-se que para uma menor PC (μm) a suplementação de 1253 FTU/kg é o suficiente. Para que ocorra uma maior relação V:C (μm) o nível de suplementação de 1188 FTU/kg é o ideal.

Tabela 03 - Morfometria do duodeno e do epitélio do magno de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de fitase

Tratamentos	Nível de FTU	PC (μm)	AV (μm)	V:C	EPM (μm)
T1	0	205,48	1907,65	9,78	23,75
T2	500	168,94	1886,33	11,85	28,27
T3	1000	154,70	1627,82	11,85	30,27
T4	1500	149,92	1506,95	10,63	32,28
T5	3000	208,34	1830,22	9,19	40,60
CV (%)		25,73	17,29	32,50	25,00
VALOR P		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
REGRESSÃO	L	0,0516	0,0223	0,0046	<0,0001
	Q	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7958

(Profundidade de cripta: $y = 0,00003x^2 - 0,0752x + 203,66$; R^2 99; Min: 1253 FTU/kg), (Altura de Vilo: $y = 0,0001x^2 - 0,486x + 1973,3$; R^2 0,82; Min: 2430 FTU/kg), (Relação Vilo:Cripta: $y = -0,0000008x^2 + 0,0019x + 10,307$; R^2 0,70; Max: 1188 FTU/kg), (Epitélio do Magno: $0,0054x + 24,599$; R^2 0,99).

Não houve diferenças morfológicas em relação às dobras do magno diante dos diferentes tratamentos, assim como o estágio de maturação de suas glândulas não diferiu, entretanto, pode ser notadas alterações na espessura desse epitélio, (Figura 01). Observa-se um comportamento linear para o efeito dos níveis de suplementação de fitase para a variável morfométrica do epitélio do magno, ou seja, quanto maior o nível de suplementação de FTU maior a EPM (μm).

Na figura 01 observa-se a espessura do epitélio do magno de poedeiras no segundo ciclo de produção alimentadas com superdosagem de fitase. O maior nível de FTU das dietas proporcionou uma maior espessura do magno.

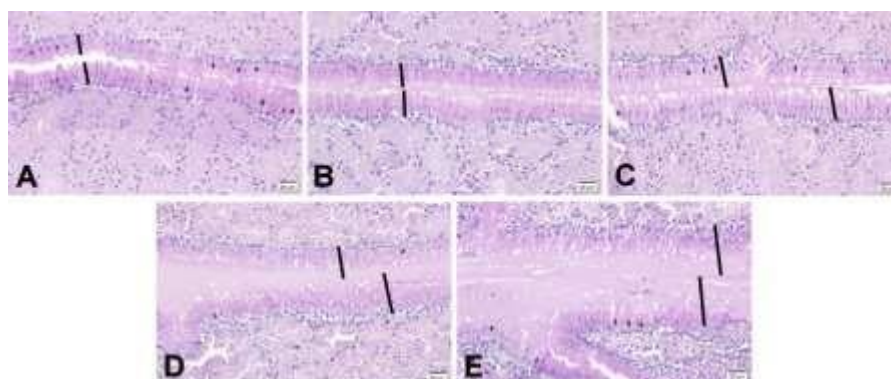


Figura 01 – Fotomicrografias de epitélio do magno de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. A: 0 FTU; B: 500 FTU; C: 1000 FTU; D: 1500 FTU; E: 3000 FTU. As barras pretas demonstram a espessura dos epitélios do magno nos diferentes tratamentos. Coloração histoquímica de periodic acid Schiff.

Para a variável do score de esteatose hepática, observa-se que houve redução na ausência de esteatose a medida que aumentou os níveis de FTU da dieta, ou seja, com o aumento dos níveis de fitase as aves apresentaram um surgimento de vacúolos citoplasmáticos lipídicos dos hepatócitos, sendo que o grau 1 desta lesão caracterizando pouca esteatose registrou uma maior probabilidade de aparecimento quando houve aumento dos níveis de FTU, observa-se também que não houve o registro de esteatose avançada (score 3) nos animais (Figura 2).

A presença de uma maior quantidade de vacúolos citoplasmáticos lipídicos dos hepatócitos caracterizando o score 1 foi mais aparente nos animais que receberam 1500 de FTU nas dietas (Figura 3).

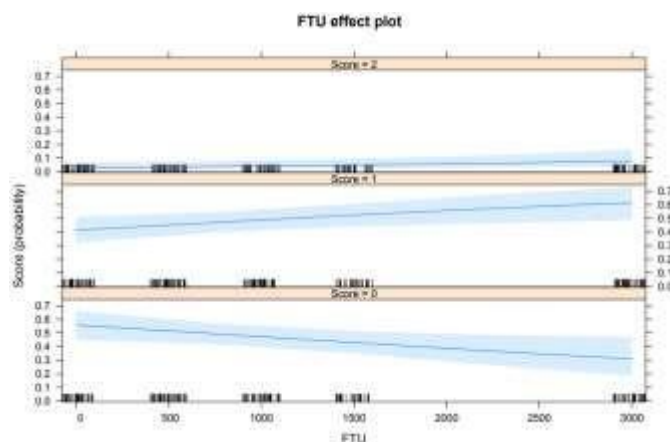


Figura 2 - Avaliação do score de esteatose hepática de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. Score: 0 (ausência de esteatose), 1 (pouca esteatose), 2 (esteatose moderada) e 3 (esteatose avançada).

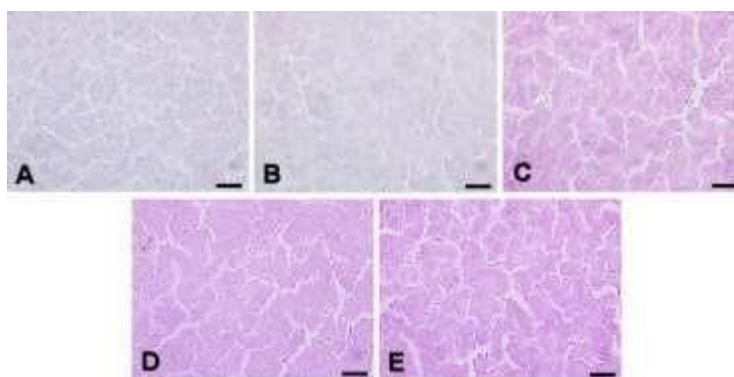


Figura 3 – Fotomicrografias do fígado de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. A: 0 FTU; B: 500 FTU; C: 1000 FTU; D: 1500 FTU; E: 3000 FTU. Coloração histoquímica de periodic acid Schiff.

Na figura 04 observa-se a análise referente a concentração de glicogênio hepático de poedeiras alimentadas com superdosagem de fitase bacteriana. É possível visualizar um comportamento linear dos resultados sendo que a medida que houve um aumento nos níveis de FTU nas dietas experimentais houve uma maior presença de positividade na concentração de glicogênio, tornando menos frequente a probabilidade de aparecimento dos scores 0 e 1 que representam ausência e pouca positividade de glicogênio respectivamente.

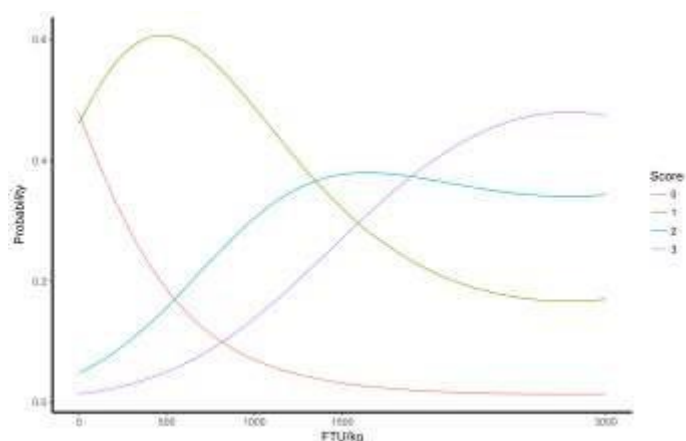


Figura 04 – Concentração de glicogênio hepático em poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. *0 (ausência de positividade), 1 (pouca positividade), 2 (positividade moderada) e 3 (positividade intensa)

Na figura 05 observa-se que houve efeito linear para os níveis de suplementação de fitase sobre os scores adotados para avaliar as dobras uterinas do aparelho reprodutor das poedeiras em segundo ciclo de produção. Verifica-se que não suplementando fitase nas dietas, houve uma maior probabilidade para o surgimento de dobras secundárias

regulares (score 2), esta probabilidade diminuiu a medida que os níveis de FTU aumentou nas dietas.

A superdosagem de fitase de 1500 e 3000 FTU/kg ficou caracterizada pelo aumento das dobras secundárias e terciárias regulares (escore 3), e muitas dobras terciárias (escore 4) no útero das aves

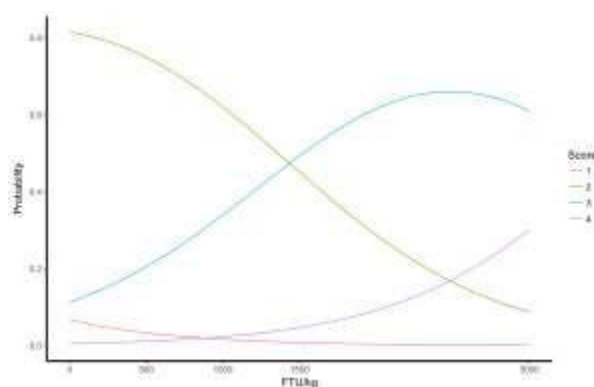


Figura 05 – Avaliação do escore das dobras do útero de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. Poucas dobras - 1, dobras secundárias regulares - 2, dobras secundárias e terciárias regulares - 3, muitas dobras terciárias - 4.

Analisando as fotomicrografias do útero das poedeiras (Figura 06), tornam-se claro os resultados obtidos na análise estatística utilizada para os scores das dobras do útero. A imagem “A” (T1 - 0 FTU) demonstra claramente a quantidade de dobras no útero destes animais, sendo que na imagem “B” (T2 - 500 FTU) observa-se o aparecimento de algumas dobras a mais assim como na imagem “C” (T3 - 1000 FTU). Destaca-se a imagem “D” (T4 - 1500 FTU) e “E” (T5 - 3000 FTU) a quantidade de dobras uterinas encontradas caracterizadas pelo escore 3 e 4.

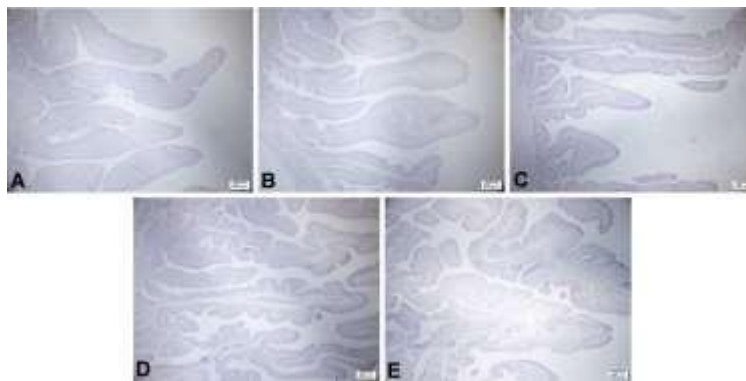


Figura 06 – Fotomicrografias das dobras do útero de poedeiras leves com 64 semanas alimentadas com diferentes níveis de FTU nas dietas. A: 0 FTU; B: 500 FTU; C: 1000 FTU; D: 1500 FTU; E: 3000 FTU. Coloração histoquímica de periodic acid Schiff.

Discussão

O objetivo do presente estudo foi avaliar a suplementação de fitase exógena em uma superdosagem para poedeiras leves no segundo ciclo de produção (44 a 64 semanas). Tendo como hipótese que a suplementação de fitase hidrolisa as moléculas de ácido fítico aumentando a digestibilidade e disponibilidade de minerais, aminoácidos e energia, contribuindo com o desenvolvimento do trato digestório das aves melhorando o desempenho produtivo dos animais por ter influência no aparelho reprodutor das poedeiras.

O uso de fitase como aditivo nas dietas de aves tem como objetivo liberar o fósforo presente nas moléculas de fitato além de agir neutralizando os efeitos antinutricionais causados pela presença da molécula de ácido fítico na digestão e absorção dos nutrientes. Para que a enzima proporcione tais efeitos extra fosfórico uma superdosagem de fitase é recomendada, em média, o nível de 1500 FTU/kg suplementado em dietas composta por milho e farelo de soja proporciona melhorias nos resultados de desempenho e qualidade dos ovos das aves no segundo ciclo de produção.

Vários fatores aqui analisados explicam a ação da superdosagem de fitase beneficiando os resultados zootécnicos das poedeiras. Um parâmetro que pode refletir no desempenho dos animais e aproveitamento dos nutrientes é a morfometria intestinal dos animais. No presente estudo verifica-se uma maior relação vilo:cripta e o que aparenta ocorrer com a suplementação da superdosagem de fitase é uma melhoria no aparelho digestório das aves, o qual pode estar relacionado com a inibição da ação do fitato.

Uma maior relação V:C, caracterizada por criptas rasas e vilos compridos, sendo um indicativo de uma menor proliferação celular. Havendo essa redução no *turnover* proteico do epitélio intestinal as exigências energéticas de manutenção dos animais diminuem possibilitando um aporte energético destinado à produção, sendo também um indicativo de melhor saúde intestinal. Esta variável histomorfométrica está diretamente ligada aos dados de produção, pois tem papel importante na digestão e absorção dos nutrientes que serão utilizados no metabolismo energético dos animais (Arruda et al., 2008) refletindo nos dados de produção e qualidade dos ovos de poedeiras.

Animais que recebem suplementação média de 1500 FTU/kg nas dietas produz uma quantidade maior de gema e albúmen refletindo no peso final dos ovos. Este dado se torna interessante quando analisada a eficiência produtiva, devido ao fato do animal não necessitar comer mais para ter um ovo mais pesado. Este benefício proporcionado

pela adição da fitase nas dietas possibilita uma conversão alimentar por massa de ovo melhorada.

O fato das enzimas exógenas possibilitarem um acréscimo no peso dos ovos produzidos pode ser explicado pela hidrólise do fitato, essa molécula quando presente nas dietas forma complexos com nutrientes deixando o fósforo indisponível podendo ainda interferir na disponibilidade de aminoácidos, agindo como fator anti nutricional (Cowieson et al., 2004) e comprometendo o desempenho dos animais. Assim, verifica-se que a degradação das moléculas de ácido fítico ocorreu de forma eficiente com a superdosagem da fitase, esta afirmação é possível após correlacionar à adição da enzima em níveis crescentes nas dietas com as melhorias no desempenho produtivo das aves. Nesse contexto pode-se observar também que a ação da enzima fica limitada a presença do substrato (fitato), explicando o efeito quadrático para as variáveis em discussão, ou seja, a ação da enzima fica restrita à quantidade de ácido fítico das dietas.

A ação da enzima liberando o fósforo presente na molécula de fitato ficou elucidada em estudos anteriores (Waldroup et al., 2000; Ravindran et al., 2000; Viveros et al., 2002). Esse fator proporciona uma maior concentração de fósforo circulante no organismo dos animais, o maior aporte deste mineral estará envolvido diretamente na formação do ovo das poedeiras, pelo fato do fósforo participar na formação da albumina presente no albúmen e ser estocado na gema na forma de fosfolipídeo e fosfoproteína. Este fato responde às maiores concentrações de albúmen e gema encontrados nos ovos das poedeiras que receberam suplementação de fitase.

Com relação a deposição de albúmen no ovo não verificou-se diferença significativa entre os tratamentos para as dobras do magno e quantidade de células albuminas mais ativas, as quais poderiam explicar uma maior capacidade de produção de albúmen (Lima et al., 2013), no entanto verificou-se efeito linear na espessura do epitélio do magno, ou seja, a medida que houve o aumento nos níveis de FTU das dietas a espessura do epitélio se tornou mais espessa. Esta variável pode ser interpretada como uma maior eficiência no processo de formação do ovo, em particular, no processo de deposição do albúmen, reduzindo o tempo de produção e permanência do ovo no magno. Tal afirmativa se vale do fato desse epitélio produzir muco e ser ciliado, ou seja, ajudam na taxa de movimentação do albúmen produzido e por consequência na celeridade da produção do ovo. Quanto mais espesso o epitélio, maior a produção de muco, sendo mais rápida a taxa de passagem do albúmen em produção.

Uma outra variável analisada que responde uma maior deposição dos componentes do ovo, em particular a gema, pode ser relatada pela presença de esteatose hepática. O surgimento de vacúolos citoplasmáticos lipídicos nos hepatócitos tem correlação direta com a produção de estrógeno, hormônio este que está envolvido diretamente na ovulação das aves (Johnson, 2006), nesse contexto observa-se que o score 1 de esteatose teve maior probabilidade de surgimento quando as aves receberam dietas contendo 1500 de FTU. Bunchasak & Silaspasorn (2005) afirmaram que o aumento de gordura no fígado pode ocorrer também pela maior síntese de estrogênio no ovário, em detrimento das altas taxas de produção de ovos nesta fase. Como na postura todos os órgãos e sistemas estão desenvolvidos, o excedente de glicogênio hepático, que nas fases de crescimento podem ser usado como substrato energético, começa a se acumular no fígado e ser destinada a maior produção de estrogênio, que aumentaria assim, a produção de ovos.

Alguns problemas relacionados com o surgimento de uma maior proporção de gema e albúmen no ovo poderiam surgir com relação à casca e a resistência da mesma a quebra. No entanto, observa-se que a suplementação de fitase proporcionou ovos com cascas mais espessas e mais resistentes. O processo de calcificação da casca do ovo está diretamente relacionado com o metabolismo do cálcio e do fósforo havendo ainda a influência do desenvolvimento do útero, órgão onde ocorre todo processo de formação da casca.

No presente estudo verifica-se que houve efeito significativo entre os tratamentos quando observado histologicamente o útero das poedeiras. Os resultados aqui encontrados dão suporte aos de resistência e espessura de casca dos ovos, tendo em vista que houve uma correlação entre esses resultados. Estima-se que 1217 e 750 FTU/kg em dietas a base de milho e farelo de soja as aves produziram ovo com casca mais espessa e com uma maior resistência respectivamente. E a análise das dobras uterinas demonstra que a medida que houve um incremento na suplementação de fitase este compartimento do aparelho reprodutor encontrou-se mais desenvolvido, ou seja, maior nível de FTU nas dietas resultaria em maior concentração de dobras uterinas.

As dobras uterinas demonstra a capacidade que o útero tem em depositar carbonato de cálcio na formação da casca do ovo, assim como na agilidade deste processo. Nesse contexto, pode-se afirmar que a medida que realiza-se uma superdosagem de fitase em dietas de poedeiras leves ocorre um desenvolvimento do

útero proporcionando uma maior eficiência na deposição de sais de cálcio na casca do ovo tornando-lhes mais espessa e consequentemente mais resistente.

A superdosagem de fitase também influenciou a gravidade específica dos ovos, havendo um efeito quadrático nos níveis de suplementação. Estima-se que a suplementação de 1750 FTU/kg as aves produziram ovos com maior gravidade específica. Esta variável é influenciada diretamente pela espessura da casca (Hamilton, 1982), sendo que cascas mais espessas a gravidade específica dos ovos aumenta. Assim, verifica-se que a superdosagem de fitase influencia na deposição de cálcio na casca do ovo aumentando a espessura e consequentemente melhorando a qualidade dos ovos.

A cor da gema foi influenciada pela suplementação de fitase, verifica-se um efeito quadrático para esta variável, estimando-se que suplementando o nível de 1875 FTU/kg nas dietas das aves em estudo estas produziram ovos com gemas mais escuras. A pigmentação da gema dos ovos é atribuída à presença de carotenoides na dieta das aves. Estes animais não conseguem sintetizar estas substâncias utilizadas na pigmentação do ovo, sendo necessário absorver na dieta (Stadelman & Cotterill, 1995; Garcia et al., 2002). Em estudo realizado por Karadas et al. (2010) foi observado uma maior concentração de carotenoides no fígado dos frangos de corte alimentados com níveis crescentes de fitase, tais resultados podem justificar a presença de ovos com cores mais intensas encontrados neste estudo com a suplementação de uma superdosagem de fitase. O que pode ter ocorrido é uma maior absorção destas substâncias químicas (carotenoides) as quais são armazenadas no fígado e direcionadas e estocadas no ovário das aves influenciando a coloração da gema.

No geral a superdosagem de fitase interfere em todo metabolismo energético da ave. O aumento da hidrólise de fitato pode melhorar o desempenho do animal e a eficácia da utilização de nutrientes, aumentando assim a eficiência da produção para os avicultores (Beeson et al., 2017). O presente estudo pode elucidar a melhora no metabolismo energético da ave quando avaliou-se as reservas de glicogênio hepático dos animais observando maior reserva quando os níveis de fitase foram elevados. O glicogênio hepático é a fonte primária de reserva de energia realizada por animais. Ela é utilizada primariamente para manter a glicose sanguínea equilibrada. No entanto, para que haja os estoques de glicose no fígado os processos metabólicos devem estar ajustados. A presença de fitato nas dietas ocasiona em desequilíbrio nos processos metabólicos, agindo principalmente na excreção do sódio (Cowieson et al., 2004), tendo

em vista a grande relação deste mineral com o metabolismo é necessário neutralizar a ação do fitato e reduzir a excreção do Na.

Um dos prejuízos causados por alta excreção de sódio pode ser demonstrado na funcionalidade da bomba de sódio e potássio. Em estudo realizado por Dilworth et al., (2005) foi relatado o detrimento da atividade da bomba de sódio quando os animais foram submetidos a dieta contendo ácido fítico, estes resultados foram sugeridos após a verificação dos níveis de glicose no sangue dos animais. Em estudo conduzido por Liu et al., (2008) verificou-se que houve um aumento nas concentrações de bombas de sódio e glicose nos enterócitos duodenais e jejunais de galinhas que foram alimentadas com dietas contendo a enzima exógena fitase. Assim, no trabalho realizado por Truong et al., (2014) foi proposto que a presença de fitato impede a absorção de glicose por agir na funcionalidade da bomba de sódio e potássio.

Foi demonstrado por Truong et al., (2015) que a fitase proporciona uma melhor retenção de Na, e juntamente foi observado a melhora na digestibilidade de 16 aminoácidos após análise do conteúdo da digesta localizados no jejuno proximal das aves. Os autores sugerem que a maior retenção de Na tem relevância na digestão de aminoácidos e na absorção da glicose. Nesse contexto Truong et al., (2017) confirmaram a maior reabsorção de sódio ao longo do intestino delgado, quando utiliza-se fitase nas dietas, aumentando a disponibilidade deste mineral para co-transporte de nutrientes conduzidos pela bomba de sódio.

Verifica-se assim que a superdosagem de fitase proporcionou aos animais uma maior absorção de glicose a qual foi estocada em forma de glicogênio hepático. Sendo que o acúmulo de glicogênio sugere que houve uma maior eficiência da bomba de sódio e potássio presentes nos eritrócitos. Como não avaliou-se a funcionalidade da bomba de sódio e potássio, assim como a excreção de sódio, estudos futuros devem ser realizados para comprovar a relação da superdosagem de fitase com a maior reserva de glicogênio hepático em poedeiras no segundo ciclo de produção.

Conclusão

Recomenda-se para um melhor desempenho e qualidade dos ovos a suplementação de 1500 FTU/kg de fitase bacteriana em dietas a base de milho e farelo de soja para poedeiras de 44 a 64 semanas de produção.

Referências Bibliográficas

Agresti, A. 1996. Multicategory logit models. Pages 205–220 in *An Introduction to Categorical Data Analysis*. John Wiley and Sons Inc., New York, NY.

Arruda, A. M. V., R. T. V. Fernandes, J. M. Silva, D. C. Lopes. 2008. Avaliação morfohistológica da mucosa intestinal de coelhos alimentados com diferentes níveis e fontes de fibras. *Revista Caatinga*. 21:1-11.

Beeson, L., C.L. Walk, M. R. Bedford, and O. A. Olukosi. 2017. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance nutrient utilization of broilers with regular or superdoses of phytase. *Poult. Sci.* 96:2243-2253.

Bunchasak, C., and T. Silapasorn. 2005. Effects of adding methionine in low-protein diet on production performance, reproductive organs and chemical liver composition of laying hens under tropical conditions. *International Journal of Poultry Science*, 4:301-308.

Casey, A., and G. Walsh. 2004. Identification and Characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110:313–322.

Cowieson, A.J., T. Acamovic, and M. R. Bedford. 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*, 45:101-108.

Dilworth, L. L., F. O. Omoruyi, and H. N. Asemota. 2005. Digestive and absorptive enzymes in rats fed phytic acid extract from sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Diabetol. Croat.* 34:59.–65.

Garcia, E. A., A. A. Mendes, C. C. Pizzolante, H. C. Gonçalves, R. P. Oliveira, and M. A. Silva. 2002. Efeitos dos Níveis de Cantaxantina na Dieta sobre o Desempenho e Qualidade dos Ovos de Poedeiras Comerciais. *Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia Avícolas*. 4:51–61.

Gautier, A. E., C. L. Walk, and R. N. Dilger. 2018. Effects of a high level of phytase on broiler performance, bone ash, phosphorus utilization, and phytate dephosphorylation to inositol. *Poultry Science*, 97:211–218.

Hamilton, R. M. G. 1982. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. *Poult. Sci.* 61:2022-2039.

Ishak, K., A. Baptista, L. Bianchi, F. Callea, J. De Groote, F. Gudat, H. Denk, V. Desmet, G. Korb, N. M. Roderick, MacSween, M. J. Phillips, B. G. Portmann, H.

Poulsen, P. J. Scheuer, M. Schmid, and H. Thaler. 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*. 22:696-699.

Johnson, P. A. 2006. Reprodução de Aves. In: Reece, W. O. Dukes, *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 691-701.

Józefiak, D., A. Ptak, S. Kaczmarek, P. Maćkowiak, M. Sassek, and B. A. Slominski. 2010. Multi-carbohydrase and phytase supplementation improves growth performance and liver insulin receptor sensitivity in broiler chickens fed diets containing full-fat rapeseed. *Poultry Science*, 89:1939–1946.

Karadas, F., V. Pirgozliev, A. C. Pappas, T. Acamovic, and M. R. Bedford. 2010. Effects of different dietary phytase activities on the concentration of antioxidants in the liver of growing broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94:519–526.

Lima, M. R., F. G. P. Perazzo Costa, R. R. Guerra, J. H. V. Silva, C. B. V. Rabello, M. A. Miglino, G. B. V. Lobato, S. B. S. Netto, and L. S. Dantas. 2013. Threonine:lysine ratio for Japanese quail hen diets. *J. Appl. Poult. Res.* 22:260-268.

Liu, N., Y. J. Ru, F. D. Li, and A. J. Cowieson. 2008. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens. *Journal of Animal Science*. 86:3432-3439.

Liu, N., Y. J. Ru, F. D. Li, J. Wang, and X. Lei. 2009. Effect of dietary phytate and phytase on proteolytic digestion and growth regulation of broilers. *Arch. Anim. Nutr.* 63:292–303.

Ramos, A. H., L. M. Santos, M. A. Miglino, J. A. Peres, and R. R. Guerra. 2011. Biometria, histologia e morfometria do sistema digestório do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre. *Biotemas*. 24:111-119.

Ravindran, V., S. Cabahug, G. Ravindran, P. H. Selle, and W. L. Bryden. 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Br. Poult. Sci.* 41:193–200.

SAS. 2011. SAS STAT 9.3. User's' Guide. Cary, NC, SAS Institute Inc. p.261.

Selle, P. H., and V. Ravindran. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 135:1-41.

Selle, P. H., and V. Ravindran. 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*, 113:99-122.

Stadelman, W. J., and P. COTERRILL. 1995. Egg science and technology. 4 ed. Haworth Press: New York , 591p.

Truong, H. H., S. Yu, A. Peron, D. J. Cadogan, A. Khoddami, T. H. Roberts, S. Y. Liu, and P. H. Selle. 2014. Phytase supplementation of maize-, sorghum- and wheat-based broiler diets with identified starch pasting properties influences phytate (IP₆) and sodium jejunal and ileal digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 198:248-256.

Truong, H. H., Y. Shukun, A. F. Moss, G. G. Partridge, S. Y. Liu, and P. H. Selle. 2017. Phytase inclusions of 500 and 2000 FTU/kg in maize-based broiler diets impact on growth performance, nutrient utilisation, digestive dynamics of starch, protein (N), sodium and IP₆ phytate degradation in the gizzard and four small intestinal segments. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 223:13-22.

Truong, H. H., R. M. Bold, S. Y. Liu, and P. H. Selle. 2015. Standard phytase inclusion in maize-based broiler diets enhances digestibility coefficients of starch, amino acids and sodium in four small intestinal segments and digestive dynamics of starch and protein. *Anim. Feed Sci. Technol.* 209:240-248.

Viveros, A., A. Brenes, I. Arija, and C. Centeno. 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81:1172-1183.

Waldroup, P. W., J. H. Kersey, E. A. Saleh, C. A. Fritis, F. Yan, H. L. Stilborn, R. C. Crum, and V. Raboy. 2000. Nonphytate phosphorus requirements and phosphate excretion of broiler chicks fed diets composed of normal or high available phosphate corn with and without microbial phytase. *Poult. Sci.* 79:1451–1459.